

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Hélène COLSON-GUASTALLA

1^{ère} THESE - Contribution à l'étude énergétique de quelques transformations de l'hémoglobine et de la méthémoglobine humaines.

2^{me} THESE - Propositions données par la faculté.

soutenues le 24 Mai 1956 devant la Commission d'examen

MM. BAUER

Président

WURMSER

FROMAGEOT

M^{le} CAUCHOIS

} Examineurs

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Hélène COLSON-GUASTALLA

1^{ère} THESE - Contribution à l'étude énergétique de quelques transformations de l'hémoglobine et de la méthémoglobine humaines.

2^{me} THESE - Propositions données par la faculté.

soutenues le 24 Mai 1956 devant la Commission d'examen

MM. BAUER

Président

WURMSER

FROMAGEOT

M^{le} CAUCHOIS

} *Examineurs*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552418_0036

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen..... J. PERES

G. JULIA	<i>Analyse supérieure et Algèbre supérieure.</i>	THELLIER	<i>Physique du Globe</i>
E. DARMOIS	<i>Enseignement de Physique</i>	AUDUBERT	<i>Electrochimie</i>
R. LEVY	<i>Physiologie comparée</i>	L'HERITIER	<i>Génétique</i>
FOCH	<i>Mécanique physique et expér.</i>	GRIVET	<i>Radioélectricité</i>
PAUTHENIER	<i>Electrotechnique générale</i>	PONCIN	<i>Mécanique des fluides</i>
DE BROGLIE	<i>Théories physiques</i>	THIRY	<i>Mécanique appliquée</i>
JOB	<i>Chimie générale</i>	DUBREIL	<i>Arith. et théor. des nomb.</i>
PRENANT	<i>Anatomie et Histol. comparées</i>	QUELET	<i>Chimie organique</i>
GARNIER	<i>Géométrie supérieure</i>	CAGNIARD	<i>Géophysique appliquée</i>
PERES	<i>Mécanique des fluides et appl.</i>	CHAMPETIER	<i>Chimie macromoléculaire</i>
LAUGIER	<i>Physiologie générale</i>	CUVILLIER	<i>Géol. Struct. et Géol. appliquée.</i>
M. CURIE	<i>Physique (P.C.B.)</i>	JUNG	<i>Pétrographie</i>
BARRABE	<i>Mécanique générale</i>	TRILLAT	<i>Chimie physique</i>
G. DARMOIS	<i>Géol. des prob. et Phys. Math.</i>	WIEMANN	<i>Chimie (M.P.C.)</i>
J. BOURCART	<i>Géogr. Phys. et Géol. dynam.</i>	JACQUINOT	<i>Spectroscopie et physique céleste</i>
Mme JOLIOT-CURIE	<i>Physique nucléaire et Radioactivité</i>	VASSY	<i>Physique de l'atmosphère</i>
PLANTEFOL	<i>Botanique</i>	DESTOUCHES	<i>Théories physiques</i>
CABANNES	<i>Recherches physiques</i>	M. PRUVOST	<i>Géologie</i>
GRASSE	<i>Evol. des êtres organisés</i>	AMIEL	<i>Chimie (P.C.B.)</i>
PREVOST	<i>Chimie organique</i>	HOCART	<i>Minéralogie</i>
BOULIGAND	<i>Application de l'analyse à la Géométrie</i>	J.P. MATHIEU	<i>Physique (P.C.B.)</i>
CHAUDRON	<i>Chimie appliquée</i>	COUTEAUX	<i>Biologie animale (P.C.B.)</i>
WYART	<i>Minéralogie</i>	MAY	<i>Biologie animale (P.C.B.)</i>
TEISSIER	<i>Zoologie</i>	CHOQUET	<i>Calc. diff. et Intégral</i>
MANGENOT	<i>Biologie végétale</i>	FELDMANN	<i>Biologie (P.C.B.)</i>
P. AUGER	<i>Physique quantique et Relat.</i>	GUINIER	<i>Physique (P.C.B.)</i>
MONNIER	<i>Physiologie des fonctions.</i>	JOST	<i>Biologie (P.C.B.)</i>
PIVETEAU	<i>Géologie.</i>	FORTEY	<i>Calc. des probabilités</i>
ROCARD	<i>Physique (E.N.S.)</i>	SCHWARTZ	<i>Méth. Math. de la Physique</i>
H. CARTAN	<i>Mathématiques (E.N.S.)</i>	CHOUARD	<i>Physiologie végétale</i>
LAFFITTE	<i>Chimie générale</i>	MALAVARD	<i>Aviation</i>
FAVARD	<i>Géol. Struct. et Géologie appl.</i>	BRELOT	<i>Calcul différentiel</i>
COULOMB	<i>Physique du Globe</i>	NORMAND	<i>Chimie (P.C.B.)</i>
Mlle COUSIN	<i>Biologie animale (P.C.B.)</i>	BENARD	<i>Chimie (P.C.B.)</i>
CHRETIEN	<i>Chimie minérale</i>	BUVAT	<i>Botanique (E.N.S.)</i>
P. DRACH	<i>Zoologie</i>	DUGUE	<i>Statistiques mathématiques</i>
KASTLER	<i>Physique</i>	GELOSO	<i>Chimie (S.P.C.N.)</i>
EPHRUSSI	<i>Génétique</i>	SOULAIRAC	<i>Psychophysiologie</i>
WURMSER	<i>Biol. Physico-chimique</i>	ULRICH	<i>Physiologie végétale</i>
RIVIERE	<i>Géologie (S.P.C.N.)</i>	MARECHAL	<i>Optique théorique et appl.</i>
GAUTHERET	<i>Biologie végétale (P.C.B.)</i>	KIRRMANN	<i>Théories chimiques</i>
LUCAS	<i>Physique</i>	CHADEFAUD	<i>Botanique</i>
A. THOMAS	<i>Biologie cellulaire</i>	DESTRIAU	<i>Physique (M.P.C.)</i>
ARNULF	<i>Optique appliquée</i>	M ^{lle} LE BRETON	<i>Physiologie générale</i>
M. MORAND	<i>Physique</i>	SALEM	<i>Mathématiques générales</i>
SOLEILLET	<i>Physique</i>	ESCLANGON	<i>Physique (P.C.B.)</i>
FORTIER	<i>Mécan. expér. des fluides</i>	LELONG	<i>Mathématiques générales</i>
DANJON	<i>Astronomie</i>	DEVILLERS	<i>Anatomie et Histologie comparées</i>
FROMAGEOT	<i>Chimie biologique</i>	EHRESMANN	<i>Topologie Algébrique</i>
LAPORTE	<i>Phys. génér. et radioact.</i>	FRANÇON	<i>Physique (M.P.C.)</i>
JANET	<i>Méc. anal. et Méc. céleste</i>	GLANGEAUD	<i>Géographie Physique et Géologie dynamique</i>
PETIT	<i>Biologie maritime</i>	GODEMENT	<i>Mathématiques (M.P.C.)</i>
QUENEY	<i>Météor. et dyn. atmosphér.</i>	PISOT	<i>Calcul des Probabilités</i>
GALLIEN	<i>Embryologie</i>	ROCH (E.)	<i>Géologie</i>
EICHHORN	<i>Biologie Vég. (P.C.B.)</i>	SCHATZMANN	<i>Astrophysique</i>
DE CUGNAC	<i>Biologie Vég. (P.C.B.)</i>	TERMIER	<i>Paléontologie stratigraphique.</i>
M ^{lle} CAUCHOIS	<i>Chimie Physique</i>	ZAMANSKY	<i>Mathématiques générales</i>

Secrétaire Général C. MONIER

CONTRIBUTION A L' ETUDE ENERGETIQUE
DE QUELQUES TRANSFORMATIONS DE L' HEMOGLOBINE
ET DE LA METHEMOGLOBINE HUMAINES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
MATERIEL EXPERIMENTAL et TECHNIQUES	3
<u>PREMIERE PARTIE : SPECTRES D'ABSORPTION</u>	10
I. <u>Evolution du spectre d'absorption de la</u> <u>méthémoglobine humaine en solution tam-</u> <u>ponnée en l'absence ou en présence d'urée</u>	10
A - Caractéristiques spectrales des solu- tions de méthémoglobine au cours de leur évolution ; transformation simple	12
B - Etude cinétique des modifications spec- trales de la méthémoglobine à un pH donné en présence d'urée 4 M	27
C - Etude cinétique des modifications spec- trales de la méthémoglobine en présence d'urée 4 M, à différents pH	38
D - Influence de la concentration en urée sur la vitesse d'évolution spectrale de la méthémoglobine	53
E - Discussion	60
II. <u>Hémoglobine</u>	65

DEUXIEME PARTIE : <u>POTENTIELS D'OXYDO-REDUCTION</u>	68
I. <u>Rappel de quelques généralités</u>	68
II. <u>Techniques générales de mesure des potentiels d'oxydo-réduction</u>	74
III. <u>Introduction à l'étude du potentiel d'oxydo-réduction du système hémoglobine-méthémoglobine</u>	78
IV. <u>Potentiel d'oxydo-réduction du système hémoglobine-méthémoglobine en présence d'urée</u>	86
A - Evolution du potentiel correspondant à un taux donné d'oxydation globale	86
B - Comparaison des potentiels d'oxydo-réduction du système hémoglobine-méthémoglobine humaines non évoluées, en l'absence ou en présence d'urée	98
V. <u>Potentiel d'oxydo-réduction en présence d'urée de la méthémoglobine déjà évoluée dans l'urée et de sa forme réduite</u>	108
VI. <u>Influence de l'urée sur les potentiels d'oxydo-réduction des systèmes ferro-ferrihémines, et ferro-ferrihémines complexés à l'histidine</u>	113
CONCLUSION	117
BIBLIOGRAPHIE	119

INTRODUCTION

Il est bien connu que la méthémoglobine - dans laquelle le fer du groupe prosthétique est à l'état ferrique - est beaucoup plus fragile vis à vis des agents "dénaturants" que ne l'est l'hémoglobine - dans laquelle le fer du groupe prosthétique est à l'état ferreux - le groupe prosthétique joue donc un rôle fondamental dans la stabilité de la molécule d'hémoprotéine.

Le présent travail se rapporte à l'étude des transformations de la méthémoglobine et de l'hémoglobine humaines en présence d'urée, dans des conditions différentes de température et de pH.

Les hémoprotéines sont des protéines colorées, et leur spectre d'absorption dans la région visible du spectre caractérise le groupe prosthétique et la liaison de ce groupe avec le reste de la molécule. D'autre part, les hémoprotéines possèdent des propriétés oxydo-réductrices - elles doivent ces propriétés au fer du groupe prosthétique, mais leur potentiel d'oxydo-réduction dépend de la protéine liée au groupe prosthétique. On a donc suivi les transformations des hémoprotéines étudiées par les modifications de leur spectre d'absorption et par les modifications de leur potentiel d'oxydo-réduction. L'étude de leur vitesse de sédimentation, par ultracentrifugation, a donné des indications sur les changements éventuels de leur masse moléculaire.

Les travaux de divers auteurs conduisent à écarter l'idée d'une forme "dénaturée" unique ; toutefois il est possible de se placer dans des conditions telles que l'on puisse isoler une transformation simple, et l'on peut alors déterminer quelques données énergétiques de cette transformation.

La première partie de ce travail se rapporte à l'étude de l'évolution du spectre d'absorption de la méthémoglobine en solution tamponnée, en l'absence ou en présence d'urée ; après avoir déterminé les conditions dans lesquelles il est possible d'isoler une transformation simple, on étudie la cinétique de cette évolution (à différentes températures et à différents pH). On indique ensuite, pour mémoire, quelques résultats relatifs au comportement de l'hémoglobine en présence d'urée.

La deuxième partie est consacrée à l'étude des variations du potentiel d'oxydo-réduction du système hémoglobine-méthémoglobine, dans des conditions identiques à celles où l'on a suivi l'évolution du spectre d'absorption de la méthémoglobine.

° °

°

MATERIEL EXPERIMENTAL ET TECHNIQUES

I. Préparation de l'oxyhémoglobine et de la méthémoglobine.A - Oxyhémoglobine.

L'oxyhémoglobine utilisée dans le présent travail est préparée à partir de sang humain du groupe B ^x, conservé en présence de citrate de sodium à pH 6,5 (45). Toutes les opérations sont effectuées entre 2°C et 4°C. Les hématies, séparées du plasma par centrifugation, sont lavées quatre fois à l'aide d'une solution de chlorure de sodium à 10 g./litre. Chaque lavage est suivi d'une centrifugation (1000 à 1500 g).

Pour séparer l'oxyhémoglobine des stromas, on ajoute aux hématies un volume égal d'eau bidistillée, ce qui provoque l'hémolyse, puis après repos de 1 à 2 heures, un quart de leur volume de toluène bidistillé. on agite, puis on filtre sur papier filtre mouillé : on obtient une solution limpide d'oxyhémoglobine (sa concentration est

^x Il n'existe aucune raison de penser que la nature du groupe sanguin ait quelque influence sur les propriétés de l'hémoglobine, et si nous avons utilisé le sang du groupe B, c'est parce qu'il était couramment fourni par le Centre National de Transfusion Sanguine au laboratoire pour d'autres travaux.

de l'ordre de 6 à 12 millièmes de fer par litre, soit environ 100 à 200 grammes de protéine par litre) : le toluène et les stromas qu'il a fixés restent sur le filtre. On maintient la solution d'oxyhémoglobine à la glacière, où elle paraît conserver ses propriétés (du moins celles qui seront étudiées ici) pendant deux semaines environ.

C'est à dessein que nous avons évité de faire cristalliser l'oxyhémoglobine : les hautes concentrations salines nécessaires pour obtenir cette cristallisation (phosphates de potassium de concentration 2 M, sulfate d'ammonium en solution saturée) sont susceptibles de modifier la structure même de la molécule protéique, comme en témoignent les changements de certaines propriétés (6). Je me suis bornée à éliminer les impuretés constituées par des protéines étrangères en utilisant la propriété qu'a l'oxyhémoglobine de ne pas mousser (Dognon et Gougerot (17, 18, 22)). La solution d'oxyhémoglobine est placée dans un ballon dont le col est muni d'un robinet rodé que l'on peut relier à une trompe à eau. Dès que l'on fait le vide dans ce récipient, l'oxyhémoglobine perd son oxygène, et donne de l'hémoglobine (la solution, d'abord rouge vif, vire au violacé), et ce départ de gaz provoque le moussage de la solution. Les mousses sont éliminées dans un flacon de garde. On fait ensuite rentrer l'air doucement : l'hémoglobine se transforme à nouveau en oxyhémoglobine, et la solution ne mousse pratiquement plus si l'on refait le vide sur elle. Elle conserve cette propriété pendant plusieurs heures à la glacière, puis elle devient à nouveau capable de donner des mousses, ce qui peut s'expliquer par la formation d'une petite quantité de méthémoglobine (qui est décelable spectralement si l'on at-

tend plus longtemps).

Après moussage et avant l'utilisation, on détermine le titre de la solution d'oxyhémoglobine par son absorption sur une longueur d'onde déterminée : d'après Drabkin et Austin (20), la densité optique d'une solution d'oxyhémoglobine contenant 1 milliatome de fer par litre, pour une épaisseur de 1 cm, est : 15,2 sur la longueur d'onde 575 mμ, 14,8 sur la longueur d'onde 540 mμ.

B - Méthémoglobine.

La méthémoglobine est préparée par oxydation de l'hémoglobine à l'aide de ferricyanure de potassium : on verse dans l'un des compartiments d'un tube de Thunberg un volume connu de la solution moussée et de titre connu d'oxyhémoglobine, dans l'autre compartiment le volume correspondant (atome de fer à atome de fer) d'une solution concentrée de ferricyanure de potassium. On fait le vide sur la solution : l'oxyhémoglobine donne de l'hémoglobine ; on mélange le contenu des deux compartiments, on obtient en quelques secondes une solution brune de méthémoglobine, utilisable pendant quelques heures si on la conserve à la glacière. Ce mode de préparation nous a paru préférable à la méthode classique (où l'on part d'oxyhémoglobine, en présence d'un gros excès de ferricyanure de potassium), parce que cette dernière méthode oblige à maintenir la solution pendant un certain temps à une température de 35 à 40°C, puis à opérer de longues dialyses - traitements susceptibles de modifier la fragilité de la méthémoglobine.

Nous avons adopté ce protocole standard de préparation qui fournit presque toujours un matériel de propriétés bien définies. Mentionnons quelques variantes dans les traitements de l'oxyhémoglobine

ou de la méthémoglobine, en indiquant qu'elles augmentent la fragilité de ces substances :

a) nous avons parfois séparé l'oxyhémoglobine des stromas en maintenant plusieurs heures les hématies à -10°C ; après dilution (volume double) par l'eau bidistillée et ultracentrifugation (environ 15000 g) nous obtenions une solution limpide d'oxyhémoglobine, dont les propriétés anormales seront signalées page 29 ;

b) dans l'intention de garder un stock de méthémoglobine, nous avons desséché à froid une solution de méthémoglobine préalablement dialysée (travail en collaboration avec H. Chalopin) : le matériel sec ainsi obtenu possédait des propriétés reproductibles, constantes dans le temps pendant plusieurs semaines, mais il manifestait en solution une fragilité plus grande que le matériel fourni par la préparation standard (voir p.29).

Il semble donc que l'on doive éviter lors de ces préparations, les températures trop basses ou une dessiccation trop poussée.

II. Solutions.

Au cours du présent travail, on a étudié quelques propriétés de la méthémoglobine ou de l'hémoglobine en solution tamponnée, en l'absence d'urée ou en présence d'urée. Les concentrations en hémoprotéines de ces solutions sont comprises entre 10^{-3} et 5.10^{-6} atome de fer par litre.

Les tampons sont des tampons phosphates de potassium, de concentration constante en phosphates (0,04 M), amenés à force ionique constante, $\Gamma = 1$, par du chlorure de potassium ; leur pH peut varier de

5,6 à 8. Si l'on travaille ainsi à force ionique assez élevée, la participation de la protéine à la force ionique est faible, et les changements éventuels de force ionique que peuvent introduire les modifications de la protéine au cours de l'évolution étudiée sont négligeables. Les solutions d'urée sont tamponnées de la même façon.

Toutes les solutions sont faites à l'eau bidistillée. Les produits utilisés sont des produits Prolabo R.P. ; nous avons vérifié que les propriétés qui font l'objet de notre étude n'étaient pas modifiées par recristallisation des sels dans l'eau bidistillée, de l'urée dans l'alcool.

III. Mesures spectrales

Les mesures spectrales ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman, modèle DU. Cet appareil permet de connaître la longueur d'onde sur laquelle on mesure la densité optique avec une précision de 2 à 6 Å. L'erreur sur la mesure de la densité optique d'une solution ne dépasse pas 0,005 à 0,01, pourvu que les densités optiques mesurées soient comprises entre 0,1 et 0,9 ; on peut atteindre une précision plus grande (0,002) sur les variations de densité optique d'une solution si l'on a soin de maintenir cette solution dans une même cuve et si on la compare à un même témoin. Ces conditions étaient toujours réalisées dans les expériences décrites ici (on utilisait éventuellement des cuves d'épaisseurs différentes, suivant la région spectrale étudiée, ou suivant la concentration des solutions).

Lors de l'étude d'une évolution spectrale, les courbes de variation de densité optique en fonction du temps, pour chaque longueur

d'onde, permettent de construire par interpolation la courbe spectrale à un instant donné.

IV. Mesure du pH.

A - Solutions salines.

Le pH des solutions salines est déterminé à l'électrode à hydrogène ; on mesure le potentiel E de l'électrode à hydrogène par rapport à l'électrode au calomel, saturée en chlorure de potassium (voir p. 74). On utilise le potentiomètre de Jouan, monté en millivoltmètre ; la mesure de E se fait à 1 ou 2 millivolts près, ce qui conduit pour le pH à une précision de 0,02 unité environ, pourvu que l'on puisse négliger le potentiel de jonction entre la solution à étudier et la solution de référence. Le potentiel de jonction est en général négligeable entre deux solutions aqueuses diluées réunies par une solution saturée de chlorure de potassium. Mais nous ignorons la valeur du potentiel de jonction au contact d'une solution concentrée en urée ; toute comparaison des potentiels de deux électrodes, l'une plongeant dans une solution tamponnée sans urée, l'autre dans une solution tamponnée qui contient de l'urée, comporte la même éventuelle erreur systématique, inconnue, ΔV : la valeur du pH des solutions contenant de l'urée présente ainsi une erreur :

$\Delta \text{pH} = \Delta V(\text{mV})/60$. L'erreur ΔV est vraisemblablement petite ; il paraît raisonnable de la négliger ; dans certains cas, elle s'élimine exactement comme on le verra plus loin.

B - Solutions protéiques.

Le pH des solutions protéiques est déterminé à l'électrode

de verre tarée à l'aide de solutions salines - avec ou sans urée - de concentrations et de pH voisins de ceux des solutions protéiques elles-mêmes (le pH des solutions salines a été mesuré à l'électrode à hydrogène).

La précision obtenue dans la comparaison des pH des solutions à l'électrode de verre est de l'ordre de 0,03 à 0,05 unité de pH. A cette précision, nous n'avons pas noté de variation appréciable du pH des solutions étudiées dans le domaine de températures qui nous intéressait (20°C à 35°C). Aussi avons-nous effectué toutes les mesures de pH à la température ambiante.

° °
°

PREMIERE PARTIE :

SPECTRES D'ABSORPTION

I. Evolution du spectre d'absorption de la méthémoglobine

humaine en solution tamponnée, en l'absence ou en présence d'urée.

De nombreux aspects de l'étude de cette évolution à un pH voisin de 7,2 ont été dégagés lors d'un travail que j'ai effectué en collaboration avec H. Chalopin ; les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication en 1949 (7). J'ai par la suite repris cette étude, et je l'ai étendue à un domaine plus large de pH.

Depuis les travaux de Keilin (27), Haurowitz (25), Anson et Mirsky (2), il est classique de suivre les modifications de l'hémoglobine et de la méthémoglobine par leurs variations spectrales. Même si les changements introduits dans le spectre ne sont pas spécifiques de ces modifications (35), leur étude est un élément d'information.

L'étude de l'effet de la concentration et de la durée d'action de l'urée sur le degré de transformation des protéines conduit à écarter l'idée d'un produit de transformation unique (23) : on ne

peut en général parler d'une forme "dénaturée".

Toutefois il est possible de se placer dans des conditions telles que l'on puisse isoler une transformation simple, et l'on peut alors, par l'étude cinétique des modifications spectrales, déterminer quelques données énergétiques de cette transformation.

Après avoir décrit les caractéristiques des spectres d'absorption de la méthémoglobine au cours de son évolution, nous préciserons les conditions dans lesquelles il est possible d'isoler une transformation simple. Nous analyserons ensuite les résultats de l'étude cinétique des modifications spectrales qui correspondent à une telle transformation.

Conduite des expériences : Il importe que les conditions initiales de l'évolution soient bien définies. La solution concentrée de méthémoglobine est conservée à froid jusqu'au moment du mélange. Une fraction de cm^3 en est prélevée à la pipette et déposée dans une fiole préalablement amenée à la température de l'expérience. La quantité nécessaire de la solution de tampon ou d'urée, portée à la même température, est projetée vivement sur la solution concentrée de méthémoglobine.

La solution est alors maintenue dans un thermostat à eau dont la température est définie au dixième de degré. On opère des prélèvements sur cette solution et on les dépose dans la cuve optique à des temps déterminés de l'évolution ; on place immédiatement la cuve dans le compartiment du spectrophotomètre. Ce compartiment est lui-même thermostaté, à la même température. Il est difficile d'atteindre dans cet appareil une précision supérieure au demi-degré ;

c'est pourquoi nous avons préféré la technique des prélèvements à celle qui aurait consisté à maintenir la solution dans la cuve optique durant tout le temps de l'évolution.

A - Caractéristiques spectrales des solutions de méthémoglobine au cours de leur évolution ; transformation simple.

1° Spectre au temps zéro.

On le détermine directement dans le tampon, car l'évolution est très lente. En présence d'urée, on l'obtient par extrapolation ; il est identique au spectre de la méthémoglobine dans le tampon. Il varie légèrement avec la température, à un pH donné, et n'est pas le même aux différents pH (Austin et Drabkin (3)).

2° Evolution du spectre d'absorption.

En l'absence d'urée, ce spectre ne subit généralement pas de modification ; néanmoins, il est possible dans certains cas (en particulier pour des solutions très diluées de méthémoglobine), de mettre en évidence une évolution qu'il est difficile de suivre longtemps car il se produit une précipitation. En présence d'urée, on observe une évolution d'autant plus rapide que la concentration en urée est plus forte ; la solution reste limpide, sans que survienne aucune précipitation ; on peut suivre ainsi l'évolution aussi longtemps qu'on le désire. Si la température est inférieure à 40°C et si la concentration en urée ne dépasse pas 4,5 M, au bout d'un certain temps le spectre ne varie pratiquement plus ; il n'est plus possible au contraire de fixer un terme à l'évolution si la température dépasse 40°C,

ou si la concentration en urée est très forte.

On a donc opéré à une température inférieure à 40°C en veillant à ce que la concentration en urée soit inférieure à 4,5 M. On a observé dans ces conditions :

a - que les courbes d'absorption établies à des temps différents de l'évolution passent par des points fixes ; ces points fixes correspondent à des longueurs d'onde pour lesquelles la densité optique reste constante au cours de l'évolution.

b - que les variations de densité optique pour les différentes longueurs d'onde restent proportionnelles tout le long de l'évolution.

La figure 1, tirée de la publication de H.Chalopin et H.Colson-Guastalla (7), se rapporte à l'évolution spectrale de la méthémoglobine à pH 7,3, entre 660 μ et 390 μ ; elle met nettement en évidence l'existence de points fixes. Les figures 2a et 2b donnent à titre d'exemple la densité optique de solutions de méthémoglobine tamponnées à pH 5,7 et 6,1 en présence d'urée 4 M, pour les trois longueurs d'onde 650, 635, 620 μ , à des temps différents de l'évolution : il apparait nettement que les droites qui joignent les points correspondant aux longueurs d'onde 650 et 635 μ d'une part, 635 et 620 μ d'autre part, sont concourantes en deux points, R et S ; il en résulte que les variations de densités optiques sur ces trois longueurs d'onde restent dans des rapports constants au cours de chacune de ces évolutions.

Les critères a) et b) mentionnés ci-dessus définiront une transformation simple. J'ai volontairement limité les domaines de variation des conditions expérimentales tout le long du présent tra-

densité optique

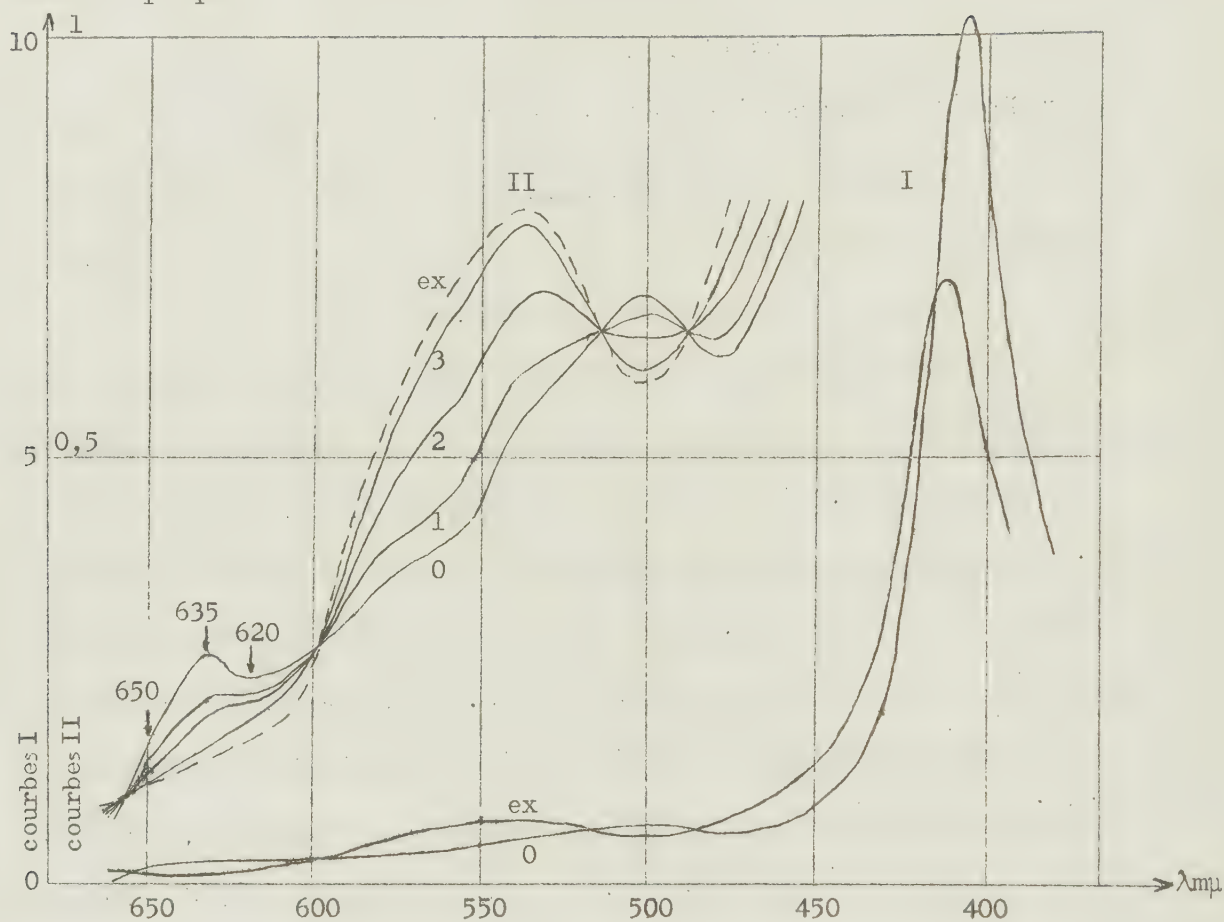


Figure 1.

Evolution du spectre d'absorption de la méthémoglobine humaine, à 30°C, en présence d'urée 4M, à pH 7,3.

Concentration en méthémoglobine: $0,5 \cdot 10^{-4}$ atome de fer par litre.

Epaisseur de la cuve: 1 cm.

Courbe 0, instant initial;
 " 1, 30 minutes d'évolution;
 " 2, 3 heures d'évolution;
 " 3, 12 heures d'évolution;
 " ex, fin d'évolution.

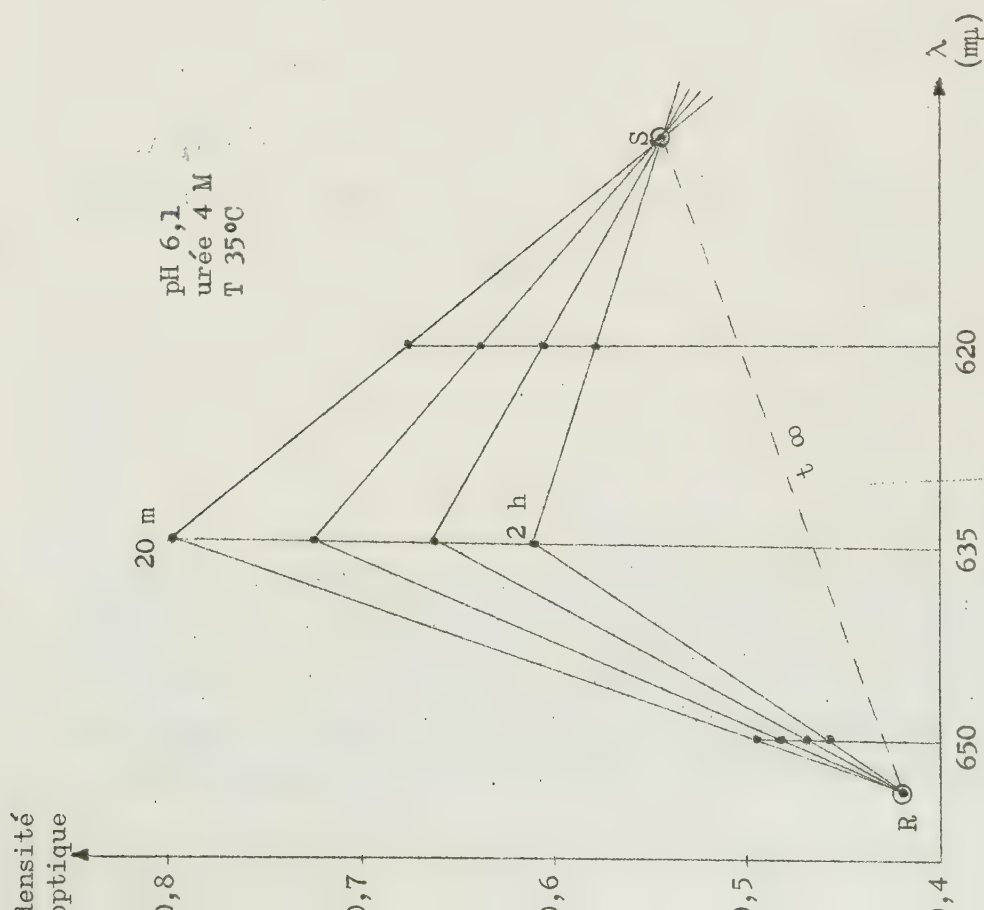


Figure 2a.

a) pH 6,1

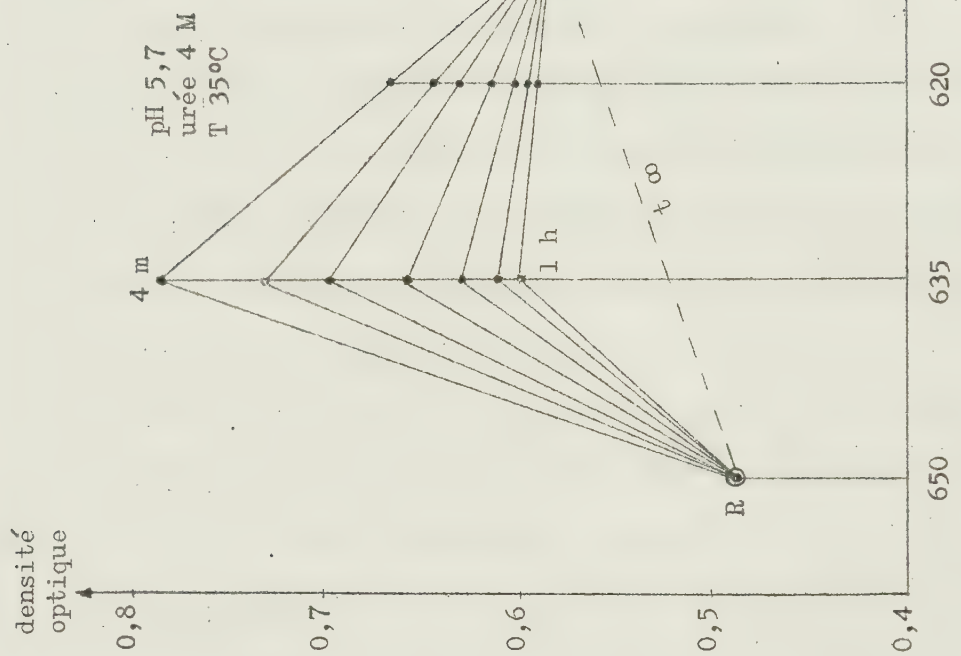


Figure 2b.

b) pH 5,7

Densités optiques sur trois longueurs d'onde à des temps différents d'évolution (méthémoglobine, urée 4 M).

Concentration en méthémoglobine: environ 10^{-4} atome de fer par litre. Epaisseur de la cuve: 1 cm.

vail de façon telle que l'évolution spectrale présente ces caractères de simplicité : pH compris entre 5,7 et 8, concentration en urée inférieure à 4,5 M, température inférieure à 40°C (en dehors de ces limites, les courbes d'absorption établies à des temps différents d'évolution cessent de passer par des points fixes).

L'évolution peut être considérée comme la transformation d'une forme spectrale initiale A en une forme spectrale unique B^x; le spectre d'absorption de A est le spectre au temps zéro de l'évolution, le spectre de B est le spectre en fin d'évolution. Les spectres de A et B dépendent du pH comme le montre la figure 2a-2b ; ils sont un peu modifiés lorsque la température varie.

On désignera : par α et β les coefficients d'absorption de A et B pour la longueur d'onde λ ; par a_0 la concentration initiale de la solution en forme A, par a et b les concentrations en forme A et B à un stade donné de l'évolution ; par d la densité optique de la solution à ce stade d'évolution, pour la longueur d'onde λ , par d_0 et d_f les densités optiques initiale et finale de la solution.

$$d_0 = \alpha a_0 \quad , \quad d_f = \beta a_0 \quad ,$$

$$d = \alpha a + \beta b \quad , \quad a_0 = a + b \quad ,$$

soit,
$$d - d_f = (d_0 - d_f) \frac{a}{a_0} .$$

x

On peut rapprocher ce résultat et son interprétation présentés par Chalopin et moi-même en 1949 (7), au sujet de l'évolution de la méthémoglobine en présence d'urée à pH 7,2, de celui qu'a exposé récemment Chalopin dans l'étude qu'il a faite de l'action du salicylate de sodium sur la méthémoglobine (Chalopin, H., Thèse, Paris 1956).

La variation de densité optique Δd , sur la longueur d'onde λ , pour une variation Δa de la concentration en A est :

$$\Delta d = (d_o - d_f) \frac{\Delta a}{a_o} ;$$

elle est tout le long de l'évolution proportionnelle à la différence des densités optiques initiale et finale ; elle est nulle en particulier (points fixes) sur les longueurs d'onde pour lesquelles A et B ont le même coefficient d'absorption.

3° Dosage des formes A et B.

Il est possible de doser les formes A et B ; en effet :

$$a = a_o \frac{d - d_f}{d_o - d_f} .$$

On peut effectuer les mesures de densité optique sur telle longueur d'onde que l'on veut ; on obtient le maximum de précision en choisissant une longueur d'onde pour laquelle la différence des densités optiques initiale et finale est maximum.

Dans le cas particulier pour lequel il existe un intervalle de longueurs d'onde où la courbe d'absorption de la forme finale est linéaire, tandis que la courbe d'absorption de la forme initiale présente une courbure, on peut utiliser pour doser la forme initiale la méthode de photométrie hétérochrome en bande étroite, mise au point par Vacher, Lortie et moi-même, en 1942 (44). Cette méthode est applicable pour doser une substance A dans un mélange, s'il est possible de trouver un intervalle de longueurs d'onde tel que seule la courbe d'absorption de cette substance A présente une courbure, tandis que les courbes d'absorption de tous les autres constituants sont linéai-

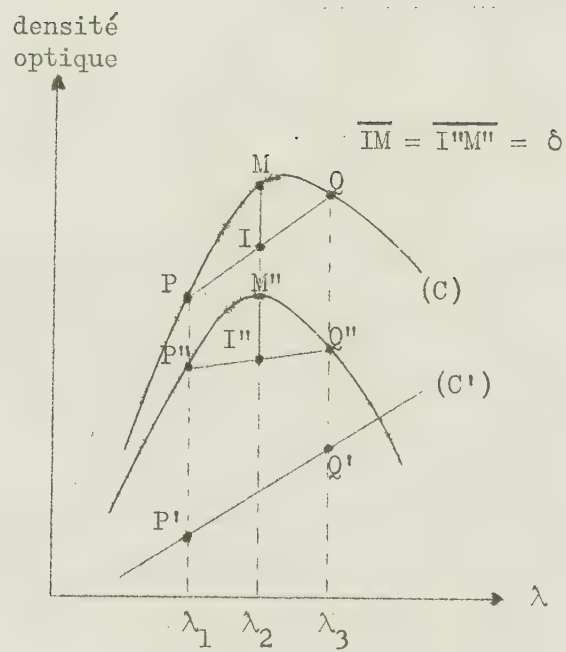


Figure 3.

Spectrophotométrie en bande étroite
(Schéma)

res dans cet intervalle de longueurs d'onde.

Soit λ_1 λ_3 cet intervalle de longueurs d'onde ; soit λ_2 la longueur d'onde équidistante de λ_1 et λ_3 . Soient d_1 , d_2 , d_3 les densités optiques du mélange sur ces trois longueurs d'onde ; soient d'_1 , d'_2 , d'_3 les densités optiques des substances autres que A, présentes dans le mélange (courbe d'absorption C', fig. 3, c'est un segment de droite), ces densités sont telles que :

$$(1) \quad \frac{(d'_1 + d'_3)}{2} = d'_2.$$

Désignons par α_1 , α_2 , α_3 les coefficients d'absorption de la substance A, à sa concentration dans le mélange, sa courbe d'absorption C'' s'obtient par différence des courbes d'absorption C du mélange et de la courbe C', on a donc :

$$\begin{aligned} \alpha_1 a &= d_1 - d'_1, \\ \alpha_2 a &= d_2 - d'_2, \\ \alpha_3 a &= d_3 - d'_3, \end{aligned}$$

soit, d'après (1) :

$$\begin{aligned} a(\alpha_2 - \frac{\alpha_1 + \alpha_3}{2}) &= d_2 - \frac{d_1 + d_3}{2}, \\ a &= k(d_2 - \frac{d_1 + d_3}{2}), \end{aligned}$$

La concentration a est proportionnelle à la différence entre la densité optique sur la longueur d'onde médiane λ_2 et la moyenne arithmétique des densités optiques sur les longueurs d'onde λ_1 et λ_3 . Cette différence mesure la longueur du segment MI, M est le point de la courbe d'absorption C qui correspond à la longueur d'onde λ_2 ; I est le point qui correspond à la même longueur d'onde sur la droite qui

coupe la courbe C aux points P et Q, longueurs d'onde λ_1 et λ_3 .
C'est ce segment MI que nous appellerons la "flèche" δ .

L'intérêt de la méthode, dans le cas qui nous intéresse ici (transformation d'une forme initiale A en une forme initiale B), c'est qu'elle ne nécessite pas la détermination expérimentale directe du spectre de la forme B, pourvu que l'on se soit assuré qu'il est linéaire dans l'intervalle de longueurs d'onde λ_1 λ_3 (on le vérifie facilement, car alors les variations $\Delta\delta$ de la "flèche" δ et les variations de densité optique Δd sur les différentes longueurs d'onde sont proportionnelles). Ceci est particulièrement précieux dans le cas où la transformation cesse d'être simple, à un certain stade de l'évolution, car le spectre en fin d'évolution - en admettant qu'il y eût alors une fin d'évolution - ne pourrait alors être considéré comme le spectre de la forme B.

Dans le cas qui est étudié ici, la courbe d'absorption à l'instant initial présente un maximum vers 635 m μ ; ce maximum s'abaisse au cours de l'évolution, et la courbe d'absorption en fin d'évolution est pratiquement linéaire entre 650 et 620 m μ . La concentration en forme initiale A est proportionnelle à la "flèche" δ :

$$\delta = 3,55 - \frac{d_{650} + d_{620}}{2}$$

(ainsi, à un pH voisin de 7, pour une concentration en méthémoglobine de $2 \cdot 10^{-4}$ atome de fer par litre, les densités optiques sur une épaisseur de 1 cm sont :

$$d_{635} = 0,780 \quad , \quad d_{650} = 0,440 \quad , \quad d_{620} = 0,680 \quad \text{et} \quad \delta = 0,220 \quad).$$

Il est possible de mesurer δ avec une précision de l'ordre de 5 % en-

viron. C'est par cette méthode que l'on a dosé la forme initiale A dans toute la suite de ce travail.

La mesure de δ à des temps déterminés de l'évolution permet d'établir la loi de la cinétique de disparition de la forme spectrale A.

4° Discussion : Rapport entre les formes spectrales et les molécules présentes dans la solution.

Le mode de représentation adopté. (forme spectrale initiale A se transformant en une forme spectrale unique B) est le plus simple qui rende compte des propriétés de l'évolution spectrale. Cependant

- 1) il peut exister des formes intermédiaires ;
- 2) les formes A et B ne sont pas nécessairement des espèces chimiques uniques.

1). Il peut exister des formes spectrales intermédiaires - On peut montrer que s'il se formait aux dépens de A une forme intermédiaire C se transformant en B, son coefficient d'absorption γ sur chaque longueur d'onde serait lié aux coefficients d'absorption de A et de B par la relation :

$\gamma = p\alpha + (1-p)\beta$, où p est un paramètre arbitraire indépendant de la longueur d'onde (relation mentionnée dans (7)). La densité optique à un stade donné de l'évolution spectrale serait :

$$d = \alpha a + \beta b + \gamma c$$

(a, b, c, concentrations de A, B, C); soit :

$$d = \alpha(a + pc) + \beta[b + (1-p)c] ;$$

ce qui revient à dire que la concentration apparente en forme A (celle que l'on mesurerait en faisant l'hypothèse d'une transformation directe

de A en B) serait en fait $(a + pc)$.

2). Les formes A et B ne sont pas nécessairement des espèces chimiques uniques -

a - Si A, ou B, est un mélange de corps présentant le même spectre, l'allure de la cinétique d'évolution spectrale peut dans certains cas renseigner sur cette éventuelle complexité, comme on le verra dans le chapitre suivant.

b - Si A ou B sont des mélanges de corps dont les spectres sont différents, on peut montrer que les proportions de leurs constituants restent constantes au cours de l'évolution.

Soient en effet $A_1, A_2, \dots, A_n$, ces constituants,

$a_1, a_2, \dots, a_n$, leurs concentrations à l'instant zéro ; la concentration initiale en A est :

$$a_0 = a_{0,1} + a_{0,2} + \dots + a_{0,n} ;$$

soient $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n$ leurs coefficients d'absorption sur la longueur d'onde λ , α celui de la forme A. La densité optique initiale est :

$$d_0 = a_0 \alpha = a_{0,1} \alpha_1 + a_{0,2} \alpha_2 + \dots + a_{0,n} \alpha_n ;$$

nous supposons que ces constituants évoluent vers le même spectre final, la densité optique finale est :

$$d_f = a_0 \beta = a_{0,1} \beta + a_{0,2} \beta + \dots + a_{0,n} \beta.$$

Au bout d'un certain temps de l'évolution, les concentrations de A_1, A_2, A_n ont varié de $\Delta a_1, \Delta a_2, \dots, \Delta a_n$, tandis que la concentration en A a varié de Δa ,

$$\Delta a = \Delta a_1 + \Delta a_2 + \dots + \Delta a_n,$$

et que la densité optique a varié de Δd ,

$$\Delta d = \alpha_1 \Delta a_1 + \alpha_2 \Delta a_2 + \dots + \alpha_n \Delta a_n - \beta(\Delta a_1 + \Delta a_2 + \dots + \Delta a_n),$$

soit

$$\Delta d = (\alpha_1 - \beta) \Delta a_1 + (\alpha_2 - \beta) \Delta a_2 + \dots + (\alpha_n - \beta) \Delta a_n.$$

Or

$$\Delta d = (\alpha - \beta) \Delta a = (d_o - d_f) \frac{\Delta a}{a_o}.$$

Exprimons Δd , d_o et d_f , en fonction des coefficients d'absorption et des concentrations ou variations de concentrations des formes A_1 ,

$A_2 \dots A_n$; nous obtenons la relation :

$$\frac{(\alpha_1 - \beta) \Delta a_1 + (\alpha_2 - \beta) \Delta a_2 + \dots + (\alpha_n - \beta) \Delta a_n}{(\alpha_1 - \beta) a_{o,1} + (\alpha_2 - \beta) a_{o,2} + \dots + (\alpha_n - \beta) a_{o,n}} = \frac{\Delta a}{a_o},$$

qui doit se trouver vérifiée pour toutes les longueurs d'onde ; comme nous avons supposé qu'il n'existe aucune relation entre les coefficients d'absorption des différents corps $A_1, A_2 \dots A_n$, cette relation doit être une identité en $\alpha_1, \alpha_2, \dots \alpha_n, \beta$, ce qui entraîne,

$$a_o \Delta a_1 - a_{o,1} \Delta a = 0,$$

$$a_o \Delta a_2 - a_{o,2} \Delta a = 0,$$

$$a_o \Delta a_n - a_{o,n} \Delta a = 0,$$

soit :

$$\frac{\Delta a}{a_o} = \frac{\Delta a_1}{a_{o,1}} = \frac{\Delta a_2}{a_{o,2}} = \dots = \frac{\Delta a_n}{a_{o,n}}.$$

Les concentrations des corps $A_1, A_2 \dots A_n$, restent donc dans des rapports constants au cours de l'évolution. Une telle condition est en particulier réalisée si les corps $A_1, A_2 \dots A_n$ sont à chaque

instant de l'évolution en équilibre d'ionisation, à pH constant.

Or le spectre initial des solutions de méthémoglobine, comme leur spectre final - observé après évolution en présence d'urée - dépendent du pH et de la température, comme on l'a déjà indiqué ci-dessus. L'évolution se présente comme la transformation d'une forme spectrale initiale en une forme finale unique, mais ces formes correspondent à des mélanges, dont les constituants gardent des proportions constantes ; on peut admettre qu'ils sont à chaque instant de l'évolution en équilibre d'ionisation, équilibre qui dépend du pH et de la température.

Ainsi la bande d'absorption 650 - ~~625~~ - 620 mμ de la méthémoglobine (en solution tamponnée) est à peu près la même lorsque le pH reste compris entre 5,5 et 7 ; si le pH devient plus alcalin, elle s'émousse, le spectre d'absorption de la méthémoglobine en milieu alcalin est pratiquement linéaire entre 650 et 620 mμ. En dosant à différents pH la méthémoglobine acide et la méthémoglobine basique par la méthode des "flèches" applicable ici, nous avons retrouvé le pK d'ionisation $\approx 8,2$, déterminé par différents auteurs, soit d'après l'étude du spectre d'absorption à différents pH (3, 24, 21), soit par d'autres méthodes (propriétés magnétiques (14, 15), potentiels d'oxydo-réduction (4)).

On interprète cette ionisation $pK \approx 8,2$ comme celle d'une molécule d'eau liée au fer dans la méthémoglobine (15, 47). La molécule de méthémoglobine contient quatre hèmes, donc quatre groupes ionisables de cette sorte ; or la courbe de titrage de la méthémoglobine révèle que les ionisations relatives à chacun des quatre hèmes de la molécule

se font de façon parfaitement indépendante (21). Ces faits suggèrent que l'on peut assimiler la forme spectrale A à la portion de molécule liée à un hème. On fera l'hypothèse provisoire que les différents hèmes sont indépendants lors des transformations qui se manifestent par l'évolution spectrale de la forme A en une forme spectrale unique B ; cette hypothèse sera discutée après l'exposé des résultats de l'étude cinétique des modifications spectrales de la méthémoglobine en présence d'urée à différents pH.

En résumé, si la concentration en urée reste inférieure à 4,5 M et si la température reste inférieure à 40°C, l'étude de l'évolution spectrale de la méthémoglobine humaine en solution tamponnée en présence d'urée entre pH 5,7 et pH 8, montre qu'il est possible de considérer cette évolution comme la transformation d'une forme spectrale initiale A en une forme spectrale unique B.

On explique les caractères de l'évolution spectrale à différents pH en admettant que les formes initiale et finale, qui dépendent du pH et de la température, correspondent à des mélanges de formes différentes à chaque instant en équilibre d'ionisation.

Le dosage des formes A et B à des temps différents de l'évolution permet d'établir la cinétique de cette transformation.

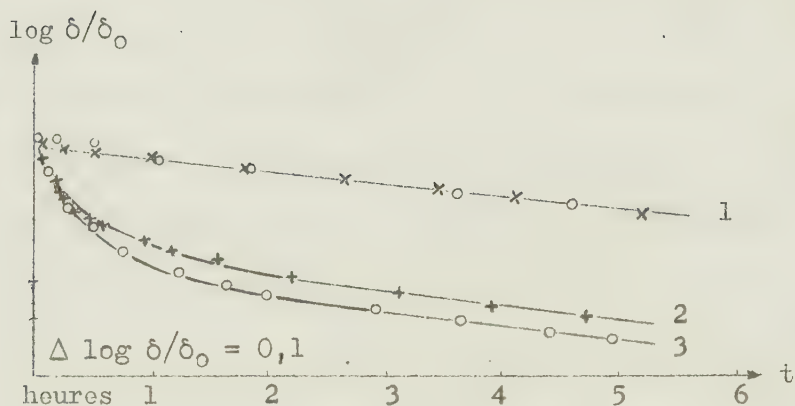


Figure 4.

Cinétiques de disparition de la forme spectrale initiale (méthémoglobine en présence d'urée 4 M, pH 7,3, $T \approx 30^\circ\text{C}$; préparation standard). Concentrations différentes en méthémoglobine (exprimées en atomes de fer par litre).

Courbe 1 : c compris entre 10^{-3} et 10^{-4} .

Courbe 2 : $c = 1,5 \cdot 10^{-5}$.

Courbe 3 : $c = 10^{-5}$.

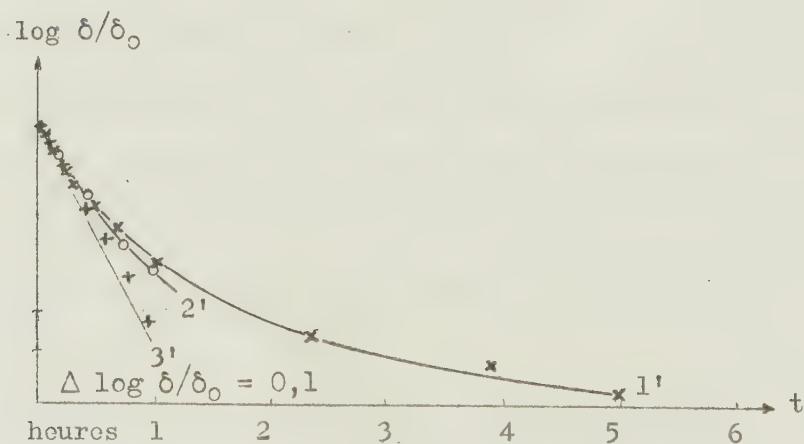


Figure 5.

Mêmes expériences que ci-dessus, mais la préparation est différente (méthémoglobine desséchée à froid).

Courbe 1' : $c = 10^{-4}$.

Courbe 2' : $c = 2 \cdot 10^{-5}$.

Courbe 3' : $c = 5 \cdot 10^{-6}$.

B - Etude cinétique des modifications spectrales de la méthémoglobine à un pH donné.

1° Description .

La concentration en forme initiale A est proportionnelle à la différence δ entre la densité optique sur la longueur d'onde 635 m μ et la moyenne arithmétique des densités optiques sur les longueurs d'onde 620 et 650 m μ (p.20). Les variations de $\log \delta$ en fonction du temps sont donc identiques aux variations de $\log (A)$, si (A) désigne la concentration en A.

La courbe $\log \delta = \varphi(t)$ est souvent une droite depuis le début de l'évolution, et ce aussi longtemps qu'il est possible de mesurer δ , c'est-à-dire jusqu'à ce que la concentration en A ne soit plus que le dixième environ de sa valeur initiale.

Cependant, il arrive qu'au début de l'évolution $\log \delta$ commence par suivre une loi de décroissance plus rapide que la loi linéaire, qu'il n'atteint que progressivement (fig. 4, 5, 6).

Nous avons observé ces particularités, Chalopin et moi-même, sur quelques-unes des solutions de méthémoglobine utilisées (concentrations en méthémoglobine, 10^{-3} à 10^{-4} atome de fer par litre, obtenues à partir d'une solution concentrée de méthémoglobine préparée suivant le protocole standard, cf.p.5) ; elles étaient plus fréquentes et plus importantes sur des solutions de méthémoglobine obtenues à partir de solutions d'oxyhémoglobine un peu vieilles, mais il

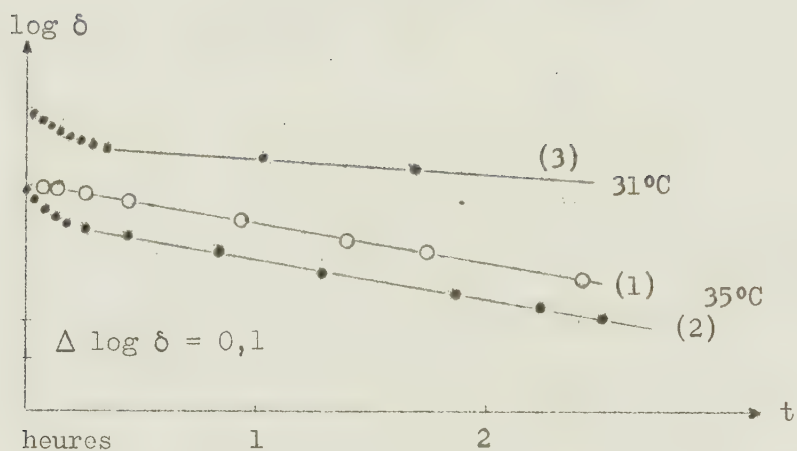


Figure 6.

Cinétique de disparition de la forme spectrale initiale (méthémoglobine en présence d'urée 4M, pH 7,2, concentration 10^{-4} atome de fer par litre).

T : 35°C ; courbe 1: méthémoglobine dissoute directement dans la solution d'urée 4 M à pH 7,2.

courbe 2: méthémoglobine amenée à pH 7,2 en présence d'urée 4 M à partir d'une solution sans urée à pH 5,5.

T : 31°C ; courbe 3: même mode de mise en solution que pour la courbe 2.

était rare que plus de 10 % de la forme initiale fût détruite lorsque l'on commençait à observer la loi de disparition linéaire.

J'ai observé cette anomalie, sans qu'elle prenne une ampleur supérieure à 12 % de la forme initiale lorsque l'oxyhémoglobine avait été préparée par congélation des hématies à -10°C puis centrifugation des stromas. Sur un échantillon de méthémoglobine desséchée à froid, la première phase rapide prend une importance considérable (50 à 60 % de la forme initiale disparaissent lorsque l'on atteint la loi linéaire, observation de Chalopin et moi-même, fig. 5).

La même particularité m'est apparue sur une solution de méthémoglobine de concentration finale 10^{-4} atome de fer par litre, obtenue de la façon suivante : la méthémoglobine avait d'abord été mise en solution à pH 5,5, en l'absence d'urée ; on l'avait amenée ensuite à pH 7,2 en présence d'urée 4 M (par addition d'une solution d'urée 7 M tamponnée à pH 7,9).

L'importance de la phase rapide augmente avec la dilution : ainsi pour une concentration de méthémoglobine de 10^{-5} atome de fer par litre, en urée 4 M, à pH 7,2, à une température de 27°C , la courbe $\log \delta = \varphi(t)$ ne devient pratiquement une droite qu'après disparition de 60 % de la forme initiale. Nous avons obtenu ce résultat sur une méthémoglobine préparée par la méthode courante à partir d'oxyhémoglobine fraîche (fig. 4). Avec des solutions très diluées de méthémoglobine desséchée à froid ($0,5$ à 1.10^{-5} atome de fer par litre), la loi d'évolution est pratiquement linéaire et la vitesse de disparition de A, $\frac{d \log (A)}{dt} = \frac{d \log \delta}{dt}$, qui est considérable (environ 50 fois plus grande que la vitesse de disparition d'un échantillon normal placé

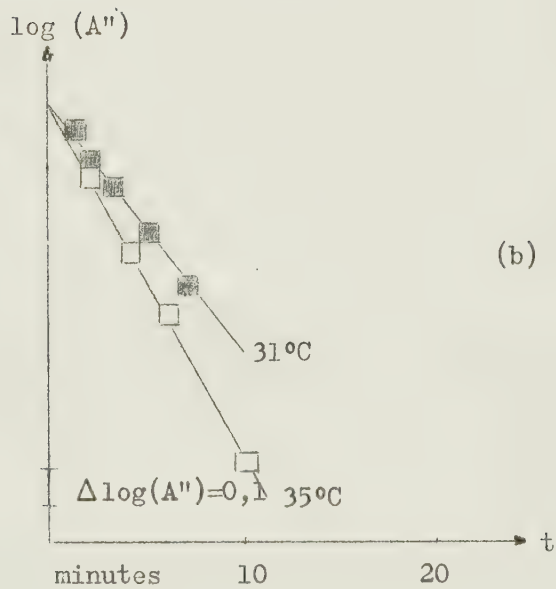
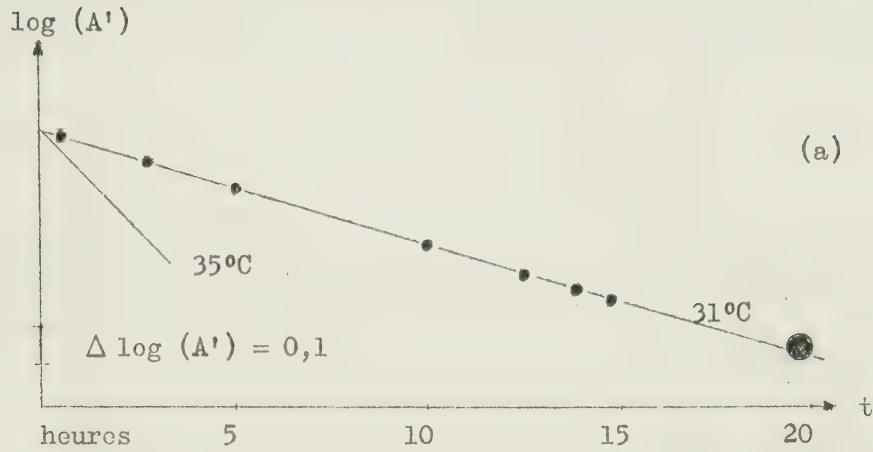
dans les mêmes conditions) est du même ordre de grandeur que celle que l'on déduit de la pente à l'origine mesurée pour des solutions plus concentrées, lorsque leur évolution présente un "arrondi initial". Ainsi, la vitesse d'évolution, lors de la phase rapide, est peu sensible à la dilution.

2° Interprétation : forme lente, forme rapide.

Ces faits suggèrent l'interprétation suivante, que nous tenterons de justifier ultérieurement. Il existe dans une solution de méthémoglobine deux formes A' et A'', présentant le même spectre A, qui évoluent indépendamment pour donner des produits de même forme spectrale B ; la forme lente A' est pratiquement la seule présente dans une solution fraîche et suffisamment concentrée de méthémoglobine préparée à partir d'oxyhémoglobine fraîche ; la forme rapide A'' est pratiquement la seule présente dans une solution très diluée de méthémoglobine desséchée à froid. Dans les cas intermédiaires ("arrondi initial"), il existe initialement en quantité appréciable les deux formes en présence ; la concentration (A'') de la forme rapide à un instant donné est la différence entre la concentration totale observée (A) et la concentration (A') en forme lente obtenue par extrapolation de la partie rectiligne de la courbe $\log (A) = \varphi(t)$.

3° Lois de disparition de la forme lente et de la forme rapide.

Si l'on évalue ainsi (A') et (A''), on constate que $\log (A'')$, comme $\log (A')$, diminuent linéairement en fonction du temps (fig. 7a, 7b) ; on est ainsi amené à considérer l'une et l'autre transformations comme des réactions d'ordre 1 pratiquement non limitées.



Figures 7a et 7b.

Lois de disparition de la forme lente A' et de la forme rapide A'' (analyse de l'évolution globale représentée par la figure 6).

(Rappelons que si une substance disparaît suivant une réaction d'ordre 1, sa vitesse de disparition dc/dt à un instant donné est proportionnelle à la concentration c , au même instant ; on désignera par j la constante de vitesse :

$$j = - \frac{dc}{dt} \times \frac{1}{c}$$

$$\ln \frac{c_0}{c} = jt$$

où c est la concentration initiale de la substance considérée. Si l'on représente graphiquement les variations de $\log c$ en fonction du temps, on obtient une droite, dont le coefficient angulaire est $-J = -j/2,3$).

La constante de vitesse j' , relative à la forme lente, est sensiblement la même, pour des conditions déterminées de pH, de concentration en urée, de température ; elle ne dépend pas de la concentration initiale en méthémoglobine . Ceci paraît nous autoriser à parler d'une forme lente, bien définie.

La constante de vitesse j'' , relative à la forme rapide, est toujours du même ordre de grandeur, mais le rapport des valeurs de j'' obtenues dans les différents cas peut atteindre 3 (mêmes conditions de pH, de concentration en urée, de température). On peut expliquer ces faits en admettant qu'il existe plusieurs variétés de formes rapides A'' , mais que l'une seulement d'entre elles est présente, pratiquement, dans chacun des cas que nous avons particulièrement étudiés.

4° Variations des constantes de vitesse de la forme lente

et de la forme rapide avec la température.

L'étude de l'évolution spectrale de la méthémoglobine à plusieurs températures montre que la disparition de l'une et l'autre formes spectrales A' et A'' est accélérée par une élévation de tempéra-

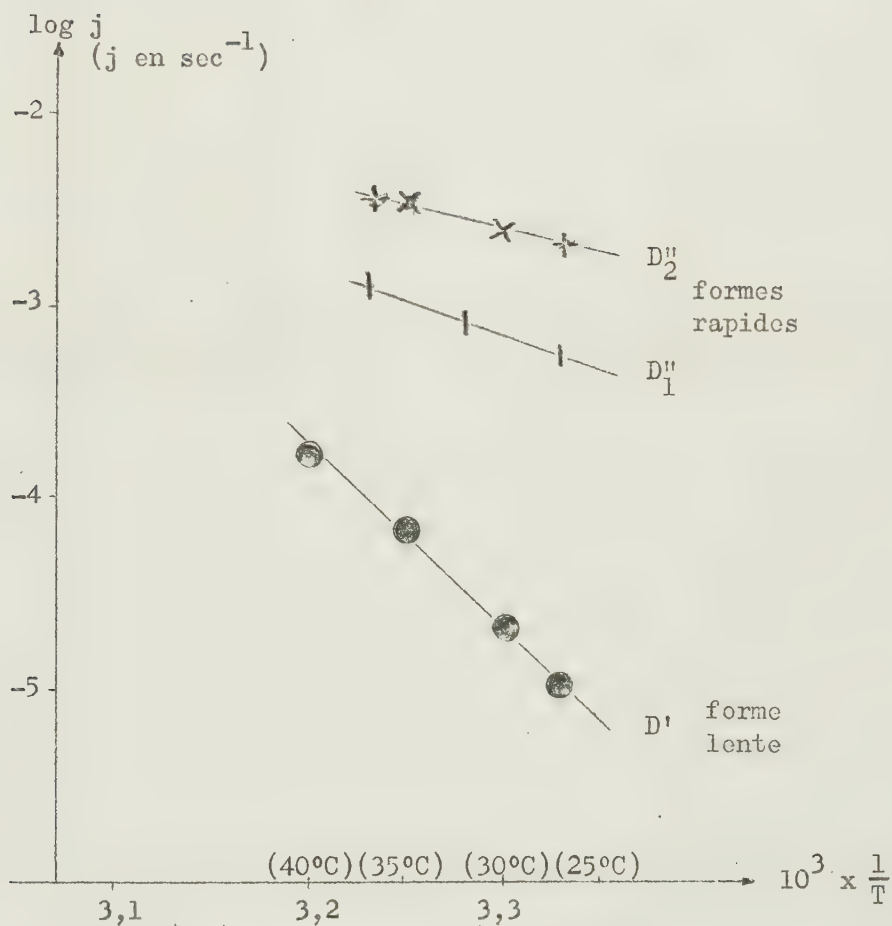


Figure 8.

Variations des constantes de vitesse de disparition de la forme lente et des formes rapides avec la température.

En ordonnées: $\log j$ (j , constante de vitesse en sec^{-1}).

En abscisses: $\frac{1}{T}$ (T , température absolue).

ture, mais que la vitesse de disparition de la forme A' est considérablement plus augmentée que la vitesse de disparition de la forme A".

La fig. 8 représente les variations de $\log j$ en fonction de $1/T$ (T, température absolue), dans les différents cas que nous avons étudiés, pour une valeur du pH voisine de 7,2, et pour une concentration 4 M en urée.

Les points expérimentaux relatifs à la forme lente se groupent tous sur une même droite D', les points relatifs aux formes rapides se groupent sur deux droites D''₁ et D''₂, moins inclinées sur l'axe des abscisses que la droite D'. La droite D''₂ réunit des points qui se rapportent à des formes rapides obtenues dans des conditions tout à fait différentes : les uns se rapportent à des solutions très diluées de méthémoglobine (concentration de l'ordre de 10^{-5} atome de fer par litre), tandis que d'autres correspondent à des solutions de méthémoglobine de concentration 10^{-3} à 10^{-4} atome de fer par litre qui ont été amenées à pH 7,2. en présence d'urée 4 M à partir de solutions sans urée, à pH 5,5. Les points de la droite D''₁ se rapportent à des solutions de méthémoglobine de concentration 10^{-4} atome de fer par litre, obtenues à partir d'un échantillon de méthémoglobine desséchée à basse température.

Ces expériences mettent donc en évidence une forme lente et probablement deux formes rapides et permettent de définir pour chacune d'elles une énergie d'activation expérimentale, constante dans l'intervalle de températures 25°C - 35°C. Ces énergies d'activation expérimentales, μ' pour la forme lente A', μ''_1 et μ''_2 pour les deux formes rapides A''₁ et A''₂ sont proportionnelles aux pentes des droites D',

D''_1, D''_2 , en effet :

$$\ln j = C - \frac{\mu}{RT}.$$

On calcule facilement μ , d'après les valeurs $\log j_1$ et $\log j_2$ de $\log j$ aux températures absolues T_1 et T_2 :

$$\mu = \frac{\log j_1 - \log j_2}{T_1 - T_2} \times 2,3 R T_1 T_2.$$

On obtient ainsi :

$$\left. \begin{array}{l} \mu' \approx 42000 \text{ cal/mol} \\ \mu'' \approx 15000 \text{ cal/mol} \\ \mu''_2 \approx 10000 \text{ cal/mol} \end{array} \right\} \pm 2000 \text{ cal/mol}$$

La théorie des vitesses absolues permet d'utiliser l'ensemble de ces résultats pour comparer d'un point de vue énergétique les formes A' , A''_1 , A''_2 . D'après la théorie des vitesses absolues, la vitesse d'une réaction quelconque est déterminée par la concentration des molécules activées ; on admet qu'il existe un équilibre entre les molécules normales et les molécules activées et, si le coefficient de transmission est égal à 1, que toutes les molécules activées, et elles seules, sont susceptibles de réagir. Si K^* est la constante d'équilibre entre molécules normales et molécules activées,

$$K^* = \frac{(\text{concentration en molécules activées})}{(\text{concentration en molécules normales})},$$

et la constante de vitesse de la réaction est donnée par la relation :

$$j = \frac{1.T}{h} K^*$$

où le facteur $\frac{1.T}{h}$ est une constante universelle (k , constante de Boltzmann, h , constante de Planck, T , température absolue). Si l'on considère la réaction d'équilibre entre molécules normales et molé-

cules activées (réaction d'activation) comme une réaction ordinaire, on peut définir l'énergie libre d'activation $\Delta F^\ddagger$, l'enthalpie d'activation $\Delta H^\ddagger$, l'entropie d'activation $\Delta S^\ddagger$,

$$\Delta F^\ddagger = - RT \ln K^\ddagger$$

$$\Delta H^\ddagger = RT^2 \frac{d \ln K^\ddagger}{dT}$$

$$\Delta F^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger.$$

La connaissance de la constante de vitesse j à plusieurs températures permet d'évaluer :

$$\Delta F^\ddagger = - RT \left(\ln j - \ln \frac{kT}{h} \right),$$

$$\Delta H^\ddagger = \mu - RT \left(\mu, \text{énergie d'activation expérimentale,} \right. \\ \left. \mu = RT^2 \frac{d \ln j}{dT} \right),$$

$$\Delta S^\ddagger = \frac{1}{T} \left(\Delta H^\ddagger + \Delta F^\ddagger \right).$$

Nous obtenons les valeurs consignées dans le tableau ci-dessous :

	$\Delta F^\ddagger$	$\Delta H^\ddagger$	$T \Delta S^\ddagger$	$\Delta S^\ddagger$	Comparaison	
					des enthalpies d'activation	des entropies d'activation
Forme lente A'	24000	42000	18000	+ 60	$\Delta H'^\ddagger - \Delta H_1''^\ddagger = \Delta H_1$ 27 000	$\Delta S'^\ddagger - \Delta S_1''^\ddagger = \Delta S_1$ + 83
Forme rap. A'' ₁	22000	15000	-7000	- 23	$\Delta H_1''^\ddagger - \Delta H_2''^\ddagger = \Delta H_2$ 5000	$\Delta S_1''^\ddagger - \Delta S_2''^\ddagger = \Delta S_2$ + 14
Forme rap. A'' ₂	21000	10000	-11000	- 37		

$\Delta F^\ddagger$, $\Delta H^\ddagger$, $T \Delta S^\ddagger$ sont exprimés en cal/mol.

$\Delta S^\ddagger$ est exprimé en unités d'entropie (cal/degré/mol).

Les valeurs de $T \Delta S^\ddagger$ et $\Delta F^\ddagger$ correspondent à une température de 30°C.

Ces résultats suggèrent que la forme lente A' est susceptible de donner dans certaines conditions une forme A''_1 qui peut elle-même se transformer en une forme A''_2 . Si l'on suppose que l'état activé correspond pour les différentes formes à des niveaux d'énergie très voisins, les différences ΔH_1 , ΔS_1 d'une part, ΔH_2 , ΔS_2 d'autre part, représenteraient les variations d'enthalpie et d'entropie des transformations



Le rapport des valeurs ΔH_1 et ΔS_1 comme celui de ΔH_2 et ΔS_2 , est le même que celui qui correspond à la rupture d'une liaison hydrogène. On peut donc penser que le passage de la forme lente aux formes rapides se fait par rupture de liaisons hydrogène (un petit nombre d'après les valeurs de ΔH_1 , ΔS_1 , ΔH_2 , ΔS_2 obtenues). La transformation de forme lente en forme rapide par effet de dilution suivant un tel processus ne nous paraît pas immédiatement explicable ; mais on conçoit fort bien que la dessiccation, à la suite de laquelle on observe la formation d'une proportion importante de forme rapide à partir de forme lente, ait entraîné la rupture de liaisons hydrogène. D'autre part, dans presque tous les cas où nous avons observé l'existence d'une forme rapide, nous avons constaté que sa vitesse d'évolution était insensible aux variations de la concentration en urée (vitesse identique en présence ou en l'absence d'urée), tandis que la vitesse d'évolution de la forme lente augmente considérablement quand la concentration en urée augmente, comme nous le verrons plus loin (p.53) ; or l'urée est susceptible de faciliter la rupture de liaisons hydro-

gène, si ces liaisons sont rompues déjà avant qu'elle soit au contact de la méthémoglobine, on comprend que son action soit sans effet.

En résumé, ces résultats mettent en évidence l'existence d'une forme lente, que nous considérerons dans ce qui suit comme la forme "native" de la méthémoglobine, et ils montrent que cette forme est susceptible de se modifier dans certaines conditions en donnant l'une ou l'autre de deux formes plus fragiles. On peut penser que cette transformation correspond à la rupture d'un petit nombre de liaisons hydrogène. L'évolution spectrale de l'une et l'autre de ces formes correspond à la transformation d'une forme initiale en une forme finale unique, par une réaction du premier ordre pratiquement non limitée.

C - Etude cinétique des modifications spectrales de la méthémoglobine en présence d'urée à différents pH.

Nous avons déjà indiqué que l'évolution du spectre garde les mêmes caractères entre pH 5,7 et pH 8 (p.16), et qu'on peut l'interpréter comme la transformation d'une forme spectrale initiale A (pH, T) en une forme spectrale unique, B (pH, T). Il est possible de doser la forme A par la méthode des "flèches" : la concentration de la forme A(pH, T) présente dans le mélange à chaque instant, est proportionnelle à la différence δ entre la densité optique sur 635 m μ et la moyenne arithmétique des densités optiques pour 650 et 620 m μ .

Nous avons représenté les variations de $\log \delta$ en fonction du temps à différents pH. La fig.9 donne quelques exemples des courbes

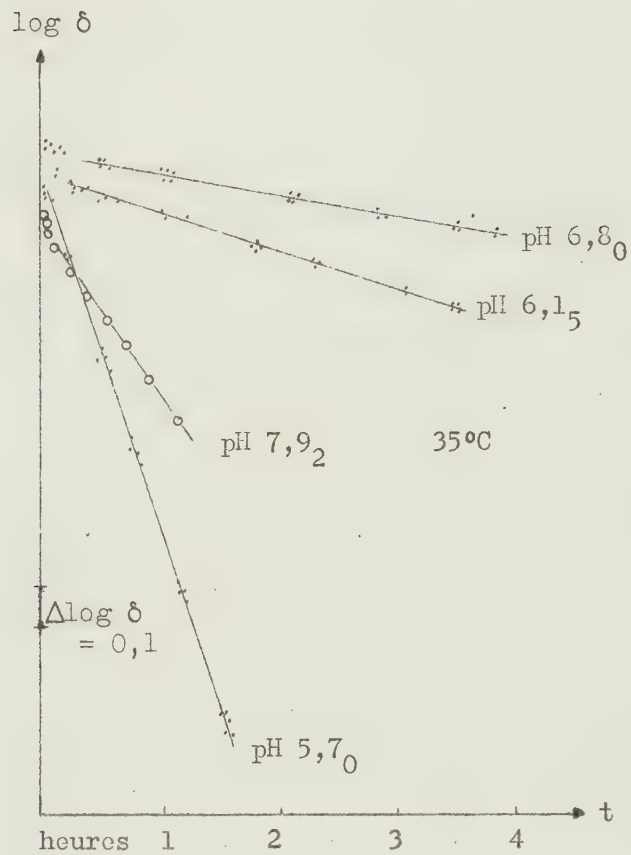


Figure 9.

Cinétique de disparition de la forme spectrale
initiale (méthémoglobine en présence d'urée 4 M,
à différents pH).

obtenues. Dans les expériences dont il est question à présent (concentration en méthémoglobine de l'ordre de 10^{-4} atome de fer par litre) l'anomalie initiale (arrondi étudié dans le chapitre précédent sur des solutions de pH voisin de 7), est souvent absente ou correspond à une diminution de la concentration en forme initiale inférieure à 10 % ; $\log \delta$ varie ensuite linéairement en fonction du temps. Nous étudions maintenant la partie rectiligne de la courbe $\log \delta = \varphi(t)$; elle correspond à l'évolution de la forme lente, souvent seule présente dans ces expériences. La courbe $\log \delta = \varphi(t)$ est une droite presque depuis le début de l'évolution : cette évolution peut donc être considérée dans tous les cas envisagés ici comme une réaction d'ordre 1 pratiquement non limitée.

La constante de vitesse de cette réaction ($j = -2,3 \frac{\Delta \log \delta}{\Delta t}$) varie considérablement avec le pH. La courbe (fig. 10) représente les variations de $\log j$ en fonction du pH : elle présente un minimum vers pH 6,8 ; entre pH 7 et pH 7,7 la constante de vitesse j est inversement proportionnelle à l'activité en ions H^+ ; la courbe s'infléchit légèrement lorsque le pH est supérieur à 7,7 ; quand le pH est inférieur à 6,5, les variations de la constante de vitesse avec le pH sont beaucoup plus importantes : ainsi, j varie au moins comme la deuxième puissance de l'activité en ions H^+ entre pH 6 et pH 5,7.

L'étude cinétique de l'évolution spectrale à différentes températures permet de définir à chaque pH l'énergie d'activation expérimentale μ de la transformation ainsi mise en évidence ($\log j = -\frac{\mu}{2,3 RT} + c^{te}$) : μ est comprise entre 40 000 et 50 000 cal/mol, entre pH 7 et pH 8, diminue rapidement vers pH 6, et atteint vers pH 5,9 une valeur prati-

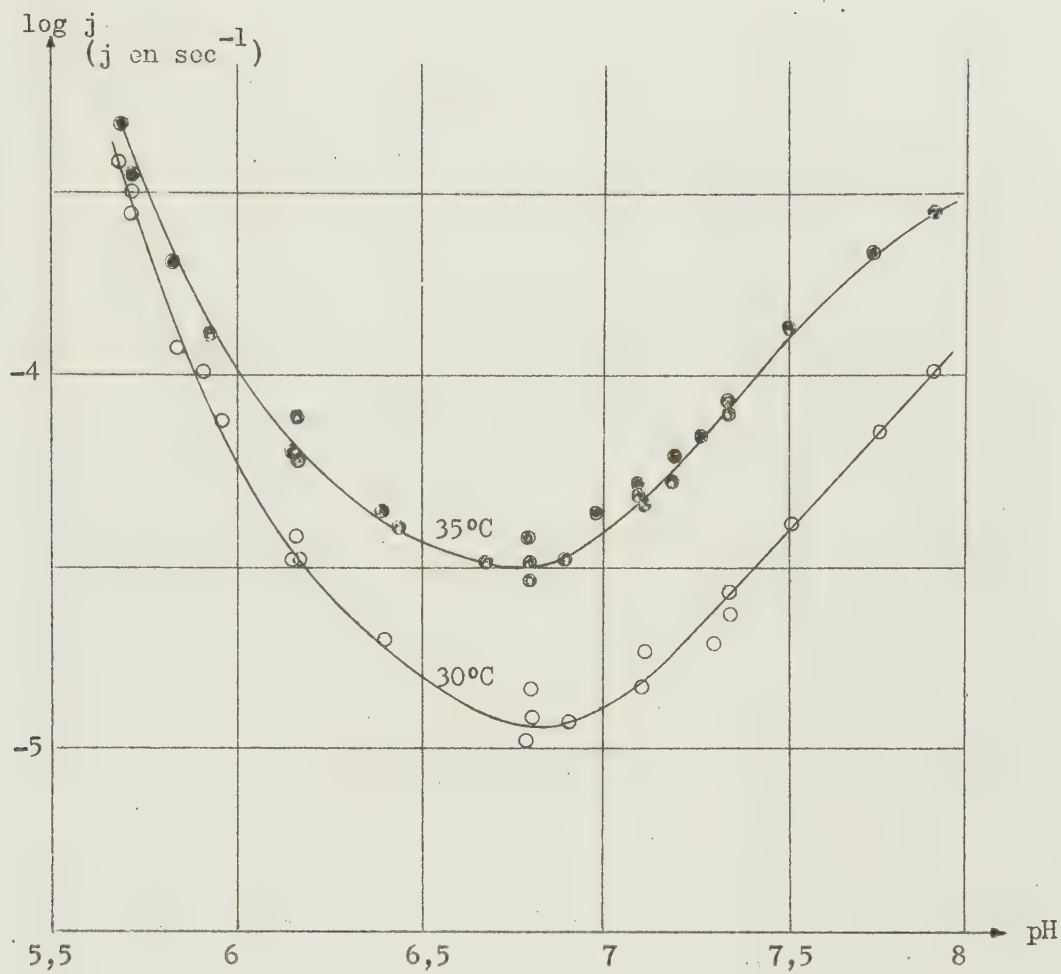


Figure 10.

Variations en fonction du pH de la constante de vitesse de disparition de la méthémoglobine (forme lente) en présence d'urée 4 M.

En ordonnées : $\log j$.

En abscisses : pH.

Points blancs : 30°C.

Points noirs : 35°C.

quement constante de 10 000 cal/mol (fig.11)(cf. Cubin (16)).

Le minimum de la constante de vitesse d'évolution de la méthémoglobine correspond au pH isoélectrique de cette protéine (pH voisin de 6,8). C'est là un fait assez général, que divers auteurs ont mis en évidence au cours de l'étude de l'action des agents dénaturants sur de nombreuses protéines (31, 30, 16). Au point isoélectrique, la charge électrique totale de la molécule est nulle, et l'on conçoit que la molécule possède alors son maximum de stabilité ; si l'on s'écarte de ce pH, la charge de la molécule augmente (négative vers les pH alcalins, positive vers les pH acides), et les forces de répulsion électrostatique entre les groupes chargés peuvent favoriser des ruptures de liaisons dans la molécule. Certains auteurs ont développé quantitativement ce point de vue ; les variations de charge nette de la molécule modifieraient sa fragilité par une action globale sur l'ensemble de la molécule (Kauzmann (26)) ; on a ainsi pu rendre compte de la dénaturation de l'ovalbumine en milieu acide.

Cependant, les résultats expérimentaux que nous obtenons sur la méthémoglobine conduisent à envisager un autre mode d'explication. Entre pH 7 et pH 7,7, la constante de vitesse de transformation de la méthémoglobine varie exactement en raison inverse de l'activité en ions H^+ ; la courbe de titrage de la méthémoglobine (46, 38) montre que dans cette zone de pH se produisent un certain nombre d'ionisations. L'exacte proportionnalité de la constante de vitesse à l'inverse de l'activité en ions H^+ suggère que parmi les différentes ionisations que subit la molécule de méthémoglobine lorsque le pH est plus alcalin que le pH isoélectrique, il s'en trouve une particulière qui augmente notablement la fragilité de la molécule.

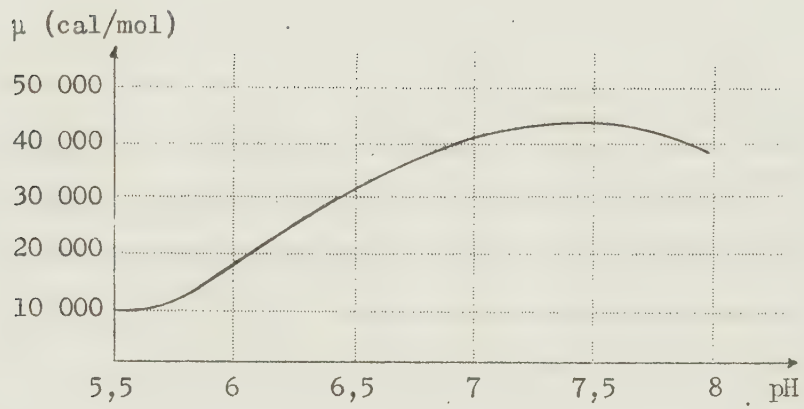
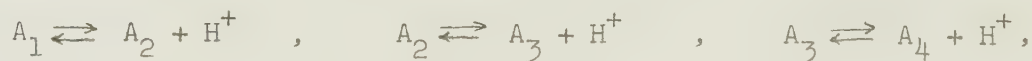


Figure 11.

Variation de l'énergie d'activation μ en fonction du pH.

La forme initiale A(pH,T) peut être considérée comme un mélange en proportion constante de formes différentes, à chaque instant en équilibre d'ionisation. Nous admettrons que seules certaines ionisations modifient la vitesse de transformation de la molécule, et nous considérerons ainsi la forme A comme un mélange d'un petit nombre de formes en équilibre d'ionisation dont les vitesses d'évolution dans l'urée sont différentes (cf. La Mer (28)). Une hypothèse identique a été développée par Levy et Banaglia (29) et appliquée par ces auteurs à la dénaturation de la ricine. L'existence d'un minimum de la constante de vitesse d'évolution globale s'explique si l'on suppose que la constante de vitesse d'évolution de l'une des formes est notablement inférieure aux constantes de vitesse de transformation des autres formes. La courbe expérimentale $\log j = f(\text{pH})$ peut s'interpréter en faisant l'hypothèse que quatre formes A_1, A_2, A_3, A_4 , dont les vitesses d'évolution sont différentes, sont en équilibre d'ionisation à chaque instant ; nous désignerons par K_1, K_2, K_3 , les constantes d'ionisation des formes A_1, A_2, A_3 .



$$K_1 = \frac{(A_2)h}{(A_1)} \quad , \quad K_2 = \frac{(A_3)h}{(A_2)} \quad , \quad K_3 = \frac{(A_4)h}{(A_3)} \quad ,$$

$(A_1), (A_2), (A_3), (A_4)$, sont les activités des formes A_1, A_2, A_3, A_4 dans la solution ; nous les confondrons avec les concentrations ; h désigne l'activité en ions H^+ .

Nous supposerons $\text{p}K_1 < \text{p}K_2 < \text{p}K_3$, et plus précisément $\text{p}K_1$ et $\text{p}K_2$ inférieurs à pH 6,8 (pH du minimum) tandis que $\text{p}K_3$ est supérieur à 6,8 ; la forme A_3 serait la plus stable.

Si l'on admet que A_1, A_2, A_3, A_4 , se transforment en formes B par des réactions d'ordre 1 dont les constantes de vitesse sont respectivement j_1, j_2, j_3, j_4 , on peut montrer que la réaction globale observée est une réaction d'ordre 1, et calculer sa constante de vitesse j :

$$\text{En effet, } \frac{dA_1}{A_1} = \frac{dA_2}{A_2} = \frac{dA_3}{A_3} = \frac{dA_4}{A_4} = \frac{dA_1 + dA_2 + dA_3 + dA_4}{A_1 + A_2 + A_3 + A_4} = \frac{dA}{A}$$

Or la variation de concentration de chacune des formes se décompose comme suit :

1° Variation de concentration due à son évolution en formes B.

2° Variation de concentration due à sa mise en équilibre d'ionisation avec les autres formes. La somme algébrique des variations de concentration des différentes formes correspondant à cette mise en équilibre est évidemment nulle, puisqu'il s'agit de transformations des différentes formes les unes dans les autres. En effet, si nous désignons par :

$d'A_1$ la quantité de A_1 qui s'ionise, en donnant A_2 ,

$d'A_2$ la quantité de A_2 qui rétrograde en A_1 ,

et si nous définissons de même les variations $d''A_2, d''A_3$, relatives à l'équilibre d'ionisation entre A_2 et A_3 , $d'''A_3$ et $d'''A_4$ relatives à l'équilibre d'ionisation entre A_3 et A_4 ; les variations de concentration des formes A_1, A_2, A_3, A_4 , sont respectivement :

$$dA_1 = -j_1 A_1 dt - d'A_1 + d'A_2$$

$$dA_2 = -j_2 A_2 dt + d'A_1 - d'A_2 - d''A_2 + d''A_3$$

$$dA_3 = -j_3 A_3 dt + d''A_2 - d''A_3 - d'''A_3 + d'''A_4$$

$$dA_4 = -j_4 A_4 dt + d'''A_3 - d'''A_4.$$

La somme $dA_1 + dA_2 + dA_3 + dA_4$ est donc égale à la somme des variations de concentrations des différentes formes correspondant à leur évolution en forme B :

$$dA_1 + dA_2 + dA_3 + dA_4 = -(j_1 A_1 + j_2 A_2 + j_3 A_3 + j_4 A_4) dt,$$

soit, en exprimant A_1, A_2, A_3 , en fonction de A_4 d'après les équilibres d'ionisation des différentes formes entre elles :

$$dA_1 + dA_2 + dA_3 + dA_4 = -A_4 \left(j_4 + \frac{j_3 h}{K_3} + \frac{j_2 h^2}{K_2 K_3} + \frac{j_1 h^3}{K_1 K_2 K_3} \right) dt$$

tandis que

$$A_1 + A_2 + A_3 + A_4 = A_4 \left(1 + \frac{h}{K_3} + \frac{h^2}{K_2 K_3} + \frac{h^3}{K_1 K_2 K_3} \right),$$

expressions qui conduisent à l'équation (1) :

$$(1) \quad j = -\frac{1}{A} \times \frac{dA}{dt} = \frac{j_4 + j_3 \frac{h}{K_3} + j_2 \frac{h^2}{K_2 K_3} + j_1 \frac{h^3}{K_1 K_2 K_3}}{1 + \frac{h}{K_3} + \frac{h^2}{K_2 K_3} + \frac{h^3}{K_1 K_2 K_3}}.$$

Il est commode de transformer l'équation (1) pour faire mieux apparaître les formes plus acides que A_3 , d'une part - soient A_1 et A_2 - et la forme plus basique que A_3 , soit A_4 ; on obtient l'expression :

$$(2) \quad j = \frac{j_4 \frac{K_3}{h} + j_3 + j_2 \frac{h}{K_2} + j_1 \frac{h^2}{K_1 K_2}}{\frac{K_3}{h} + 1 + \frac{h}{K_2} + \frac{h^2}{K_1 K_2}}.$$

L'expression (2) se simplifie si un ou plusieurs des termes qui y figurent sont négligeables devant les autres :

1° Il peut exister une région de pH suffisamment basiques pour que h/K_2 et h/K_1 soient négligeables devant 1, et que $j_2 h/K_2$ et $j_1 h^2/K_1 K_2$ soient négligeables devant j_3 et $j_4 K_3/h$. les deux premières ionisations sont alors pratiquement totales, et les formes A_1 et A_2 sont pratiquement absentes dans la solution.

On peut écrire, dans ces conditions :

$$(3) \quad j = \frac{j_4 \frac{K_3}{h} + j_3}{\frac{K_3}{h} + 1}.$$

Il est possible qu'il existe dans cette région une zone de pH pour laquelle K_3/h soit encore petit par rapport à 1, et j_3 petit aussi par rapport à $j_4 K_3/h$; on peut écrire alors :

$$(3') \quad j = j_4 \frac{K_3}{h},$$

j varie proportionnellement à $1/h$.

Pour des régions plus basiques, il n'est plus possible de négliger K_3/h devant 1, et j croît moins vite que dans la zone précédente ; l'expression de j sera :

$$(3'') \quad j = \frac{j_4 \frac{K_3}{h}}{1 + \frac{K_3}{h}}.$$

Au contraire, pour une région un peu moins basique que la zone (3') le terme $j_4 K_3/h$ devient plus petit, et il n'est plus possible de négliger j_3 devant $j_4 K_3/h$, on écrira dans une telle région :

$$(3''') \quad j = j_4 \frac{K_3}{h} + j_3.$$

2° Si le pH est suffisamment acide, ce sont les formes A_1 et A_2 qui sont seules présentes dans la solution ; on peut négliger j_3 et $j_4 K_3/h$ devant $j_1 h^2/K_1 K_2$ et $j_2 h/K_2$; j prend la forme simplifiée :

$$(4) \quad j = \frac{j_2 \frac{h}{K_2} + j_1 \frac{h^2}{K_1 K_2}}{1 + \frac{h}{K_2} + \frac{h^2}{K_1 K_2}}.$$

Tant que h/K_2 et a fortiori $h^2/K_1 K_2$ restent petits par rapport à 1, c'est-à-dire si le pH est nettement supérieur à pK_2 , l'expression de j

se simplifie encore :

$$(4') \quad j = j_2 \frac{h}{K_2} + j_1 \frac{h^2}{K_1 K_2} .$$

Examinons la courbe expérimentale $\log j = f(\text{pH})$ (fig.10) en admettant ainsi que la méthémoglobine est susceptible de subir plusieurs ionisations, l'une correspondant à un pK supérieur à 6,8 (pH du minimum), les autres à des pK plus acides, et en supposant que les constantes de vitesse de la forme basique A_4 et des formes acides A_1 et A_2 sont très nettement supérieures à la constante de vitesse de la forme neutre A_3 . Nous examinerons successivement la région pour laquelle le pH est supérieur au pH du minimum de la constante de vitesse, puis la région pour laquelle le pH est inférieur à celui de ce minimum.

1°) Région pour laquelle le pH est supérieur à celui du minimum - La portion linéaire de la courbe $\log j = f(\text{pH})$ suivant laquelle j est inversement proportionnel à l'activité en ions H^+ correspond à une zone de pH pour laquelle $j = j_4 K_3 / h$ (équation 3'). Cette zone est comprise entre pH 7 et pH 7,7 à 35°C, entre pH 7,1 et pH 8 à 30°C. Cette région de la courbe permet de déterminer la valeur de $j_4 K_3$.

Lorsque le pH devient plus alcalin, il n'est plus possible de négliger K_3/h vis à vis de 1, l'expression de j devient comme on l'a vu :

$$j = \frac{j_4 \frac{K_3}{h}}{1 + \frac{K_3}{h}} .$$

La courbe $\log j = f(\text{pH})$ présente alors un écart par rapport à la droite $\log J = \log j_4 + \text{pH} - \text{pK}_3$; cet écart a la valeur :

$$\log J - \log j = \log \left(1 + \frac{K_3}{h} \right).$$

D'après la valeur de cet écart, il est possible de tracer la courbe théorique $\log j = f(\text{pH} - \text{pK}_3)$, c'est cette courbe que donne la fig.12. Si l'on compare cette courbe à la courbe expérimentale $\log j = f(\text{pH})$, il semble que l'on puisse rendre compte de la courbure observée à 35°C, pour les pH supérieurs à 7,7, en attribuant à pK_3 une valeur comprise entre 8,1 et 8,6. La valeur ainsi obtenue pour pK_3 autorise à identifier cette ionisation à l'ionisation $\text{pK} \approx 8,2$ de la mét-hémoglobine, bien connue par ailleurs, c'est l'ionisation dont il a été question p.24. Elle correspondrait à la dissociation de l'eau liée au fer dans la méthémoglobine dite acide.

Si nous introduisons dans notre calcul cette valeur 8,2, la comparaison des courbes $\log j = f(\text{pH})$ à 35°C et à 30°C, entre pH 7,7 et pH 7,9, nous permet d'évaluer l'enthalpie de cette ionisation, soit ΔH_3 , et l'enthalpie d'activation de la transformation de la forme A_4 , soit ΔH_4^* . Si ΔH^* représente l'enthalpie d'activation globale, on peut en effet montrer que :

$$\Delta H^* = \Delta H_4^* + \frac{\Delta H_3}{1 + \frac{K_3}{h}},$$

expression qui se réduit à :

$$\Delta H^* = \Delta H_4^* + \Delta H_3$$

tant que K_3/h reste petit devant 1 ; dans ce cas, l'enthalpie d'activation ΔH^* de la réaction globale est la somme de l'enthalpie

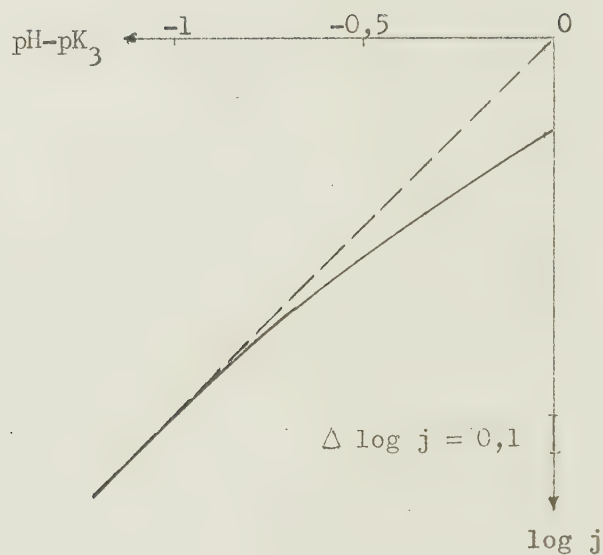


Figure 12.

Courbe théorique: $\log j = f(\text{pH} - \text{pK}_3)$.

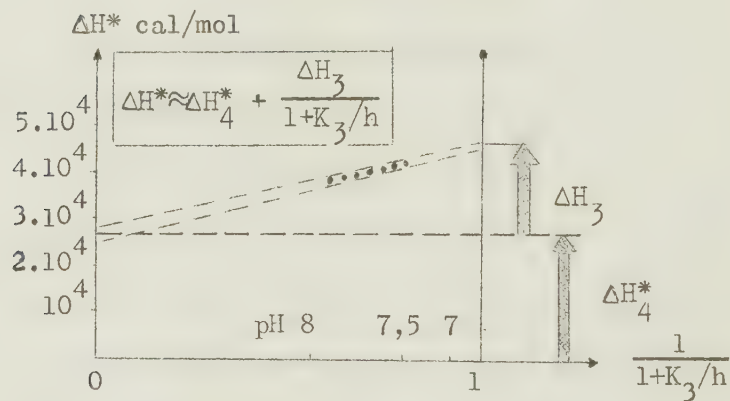


Figure 13.

Evaluation de l'enthalpie d'ionisation de la forme neutre et de l'enthalpie d'activation de la forme basique.

En ordonnées: enthalpie globale d'activation, $\Delta H^* = \mu - RT$.

En abscisses: $\frac{1}{1 + K_3/h}$.

d'activation de la forme basique A_4 , et de l'enthalpie d'ionisation ΔH_3 de la forme neutre A_3 (fig. 13).

La valeur obtenue pour ΔH_3 est de l'ordre de 16 000 à 20 000 cal/mol, c'est-à-dire par ion H^+ dissocié ; or les données relatives à cette ionisation rapportées par Wyman (47) conduisent à une valeur de 15 000 calories environ. Notre détermination ne peut pas être précise étant donné que la zone de pH utilisable est très restreinte; la concordance ainsi obtenue avec d'autres déterminations paraît renforcer l'hypothèse que nous avons formulée : l'ionisation $pK \approx 8,2$ que subit la méthémoglobine augmente sa fragilité. Il est possible de déterminer la valeur de l'enthalpie d'activation ΔH_4^* , de l'énergie libre d'activation ΔF_4^* , de l'entropie d'activation ΔS_4^* , de la forme ionisée (méthémoglobine "basique") : on obtient les valeurs suivantes :

$$\begin{aligned} \text{à } 30^\circ\text{C,} \quad \Delta F_4^* &\approx 22\,000 \text{ cal/mol} \\ \Delta H_4^* &\approx 30\,000 \text{ cal/mol} \\ \Delta S_4^* &\approx 30 \text{ unités d'entropie .} \end{aligned}$$

Entre pH 6,9 et pH 7,1, la courbe $\log j = f(\text{pH})$ approche de son minimum, elle n'est plus linéaire, on ne peut plus négliger j_3 devant $j_4 K_3/h$, et l'expression de j peut s'écrire :

$$j = j_4 \frac{K_3}{h} + j_3 .$$

L'analyse de la courbe dans cette région, bien qu'elle soit assez peu précise, permet d'obtenir une valeur approximative de la constante de vitesse j_3 . A partir des valeurs obtenues nous pouvons déduire :

$$\Delta F_3^{\ddagger} \approx 25\,000 \text{ cal/mol}$$

$$\Delta H_3^{\ddagger} \approx 45\,000 \text{ cal/mol}$$

$$\Delta S_3^{\ddagger} \approx 60 \text{ unités d'entropie.}$$

La comparaison des formes A_3 et A_4 montre que la différence des enthalpies d'activation et celle des entropies d'activation de ces formes correspondent sensiblement à l'enthalpie d'ionisation et à l'entropie d'ionisation de la forme neutre :

$$\Delta H_3^{\ddagger} - \Delta H_4^{\ddagger} \approx 15\,000 \text{ cal/mol}$$

$$\Delta S_3^{\ddagger} - \Delta S_4^{\ddagger} \approx 30 \text{ unités d'entropie.}$$

L'ionisation de la forme neutre ($pK \approx 8,2$) apparaît ainsi comme un premier stade possible de l'activation, si l'on admet que les niveaux d'énergie des formes activées $A_3^{\ddagger}$ et $A_4^{\ddagger}$ sont identiques.

2°) Région pour laquelle le pH est inférieur à celui du minimum - La constante de vitesse, d'abord sensiblement proportionnelle à l'activité en ions H^+ , croît comme la deuxième puissance de cette activité, lorsque le pH est inférieur à 6 : on peut donc penser que deux équilibres d'ionisation interviennent successivement (constantes d'ionisation K_2 et K_1), et que l'expression de la constante de vitesse observée j peut s'écrire :

$$j = j_2 \frac{h}{K_2} + j_1 \frac{h^2}{K_1 K_2}$$

cette expression se réduirait à :

$$j = j_1 \frac{h^2}{K_1 K_2}$$

dans la région extrême que nous avons explorée (pH 5,7)^x. L'énergie d'activation expérimentale mesurée est alors: $\mu = \Delta H^x + RT$

$$\Delta H^x = \Delta H_1^x - (\Delta H_1 + \Delta H_2),$$

si ΔH_1 et ΔH_2 sont les enthalpies d'ionisation des formes A_1 et A_2 . C'est l'étude, à différents pH, de l'influence de la concentration en urée sur la vitesse de l'évolution spectrale, qui apportera quelques indications sur les enthalpies d'ionisation ΔH_1 et ΔH_2 .

D - Influence de la concentration en urée sur la vitesse d'évolution spectrale de la méthémoglobine.

Rappelons que le spectre initial ne dépend pas de la concentration en urée. La vitesse d'évolution augmente considérablement avec la concentration en urée ; si la concentration en urée dépasse 4,5 M, l'évolution spectrale cesse de se présenter comme une transformation simple ; nous avons donc étudié l'influence de la concentration en urée pour des concentrations inférieures à 4,5 M. D'autre part, si la concentration en urée est trop faible, l'évolution est trop lente pour qu'on puisse mesurer sa vitesse avec sûreté ; aux températures

^x Nous n'avons pas cherché à déterminer d'après la courbe expérimentale les valeurs des différentes constantes qui figurent dans l'expression de j : c'eût été illusoire, car plusieurs ensembles de valeurs numériques différentes auraient permis une identification satisfaisante.

où l'on doit opérer (inférieures à 40°C), on ne peut utiliser une concentration en urée inférieure à 2 M. Nous avons donc fait varier la concentration en urée entre 4 M et 2 M.

L'effet d'une variation de la concentration en urée est immédiat et réversible, comme le montre l'expérience suivante : on amène à 2 M la concentration en urée d'une solution tamponnée de méthémoglobine en urée 4 M, par addition d'un volume égal de tampon de même pH et de mêmes concentrations salines ; on suit alors la cinétique de l'évolution spectrale ($\log \delta$ en fonction du temps, $\delta = d_{635} - \frac{d_{650} + d_{620}}{2}$), on constate que la constante de vitesse, proportionnelle à la pente de la droite obtenue, est immédiatement la même que pour les solutions de méthémoglobine au même pH, préparée directement en urée 2 M (fig. 14). Bien que le spectre de la forme initiale A ne soit pas modifié par des variations de concentration en urée, ces faits suggèrent une action primaire, immédiate et réversible, de l'urée sur la méthémoglobine ; cette action augmenterait sa fragilité.

Nous avons comparé, à différents pH et à différentes températures, les vitesses d'évolution de la méthémoglobine pour des concentrations en urée différentes.

1°) pH voisin de 7,2

Cette étude a été faite en collaboration avec Chalopin (résultats non publiés, v. thèse Chalopin, 1956). Elle montre (fig. 15) (a) que l'énergie d'activation expérimentale μ n'est pas modifiée de façon appréciable lorsque la concentration en urée varie entre 2 M et 4 M, μ reste voisin de 40 000 cal/mol. ; (b) que la constante de vitesse

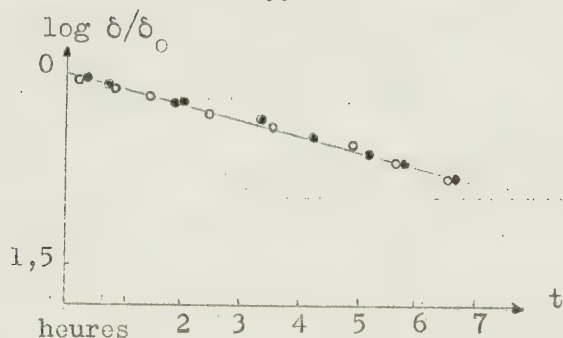


Figure 14.

Cinétique de disparition de la forme spectrale initiale (méthémoglobine en solution tamponnée, pH 5,9, à 35°C). Points noirs: solution préparée directement en urée 2 M; points blancs: solution amenée d'une concentration 4 M à une concentration 2 M en urée.

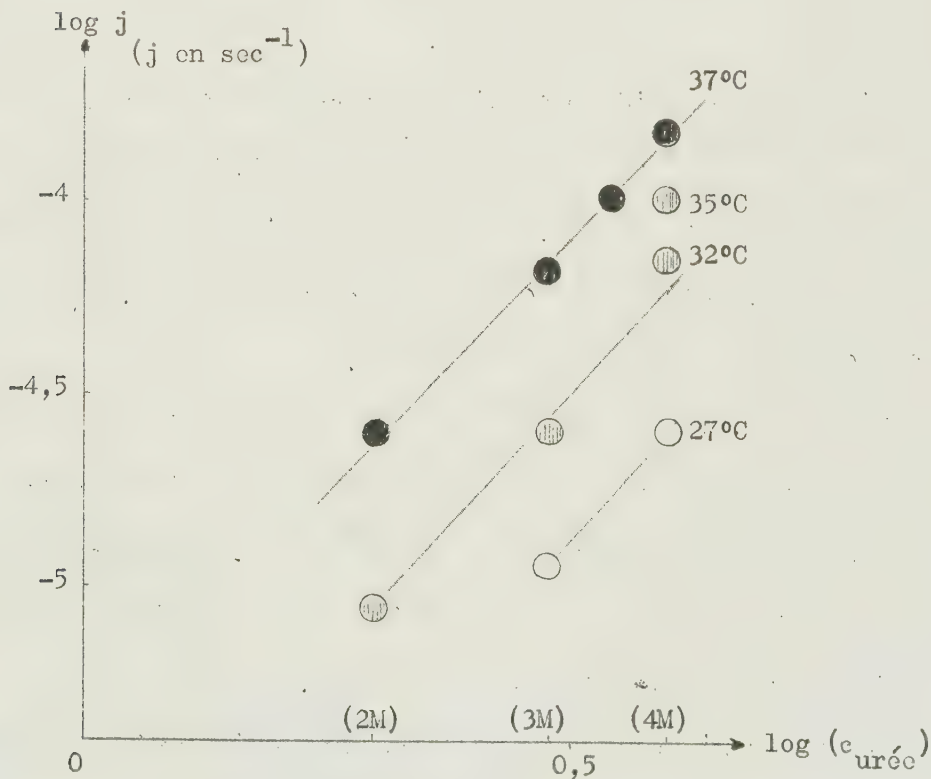


Figure 15.

Variations de la constante de vitesse de disparition de la méthémoglobine (forme lente) en solution tamponnée ($\text{pH} \approx 7,2$), avec la concentration en urée, à diverses températures.

En ordonnées: $\log j$.

En abscisses: $\log c_{\text{urée}}$.

croît comme la puissance 2,6 de la concentration en urée,

$$\log j = 2,6 \log(\text{concentration en urée}).$$

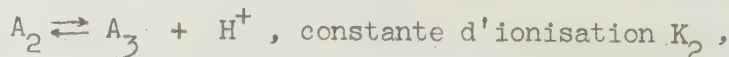
2°) pH compris entre 6,2 et 5,7

J'ai comparé l'influence du pH dans ce domaine sur l'évolution de solutions de méthémoglobine en présence d'urée 4 M et en présence d'urée 2 M. La figure 16 montre que la loi de variation de la constante de vitesse avec le pH est différente dans l'un et l'autre cas : en présence d'urée 2 M entre pH 6,2 et pH 5,8, la constante de vitesse est sensiblement proportionnelle à l'activité en ions H^+ ; vers pH 5,7, la courbe $\log j = f(\text{pH})$ s'infléchit légèrement. En urée 4 M au contraire, dès pH 6, la constante de vitesse j est proportionnelle au carré de l'activité en ions H^+ .

D'autre part, l'énergie d'activation expérimentale μ en urée 2 M est sensiblement constante entre pH 6 et pH 5,7, elle est de l'ordre de 25 000 à 30 000 cal/mol. En urée 4 M, l'énergie d'activation expérimentale, voisine de 30 000 cal/mol vers pH 6,5, tombe ensuite à 10 000 cal/mol lorsque le pH diminue.

Vers pH 6,3, pH pour lequel la loi de variation de la constante de vitesse avec le pH et la valeur de l'énergie d'activation sont à peu près les mêmes en urée 2 M et en urée 4 M, le rapport des constantes de vitesse en urée 4 M et en urée 2 M est le même qu'à pH 7,2 ($\log j_{4M} - \log j_{2M} \approx 0,8 \approx 2,6 \log 2$).

Ces faits s'interprètent en supposant qu'en urée 2 M il intervient, vers les pH acides, un seul équilibre d'ionisation,



alors qu'en urée 4 M, dès pH 6, la disparition d'une forme A_1 plus acide

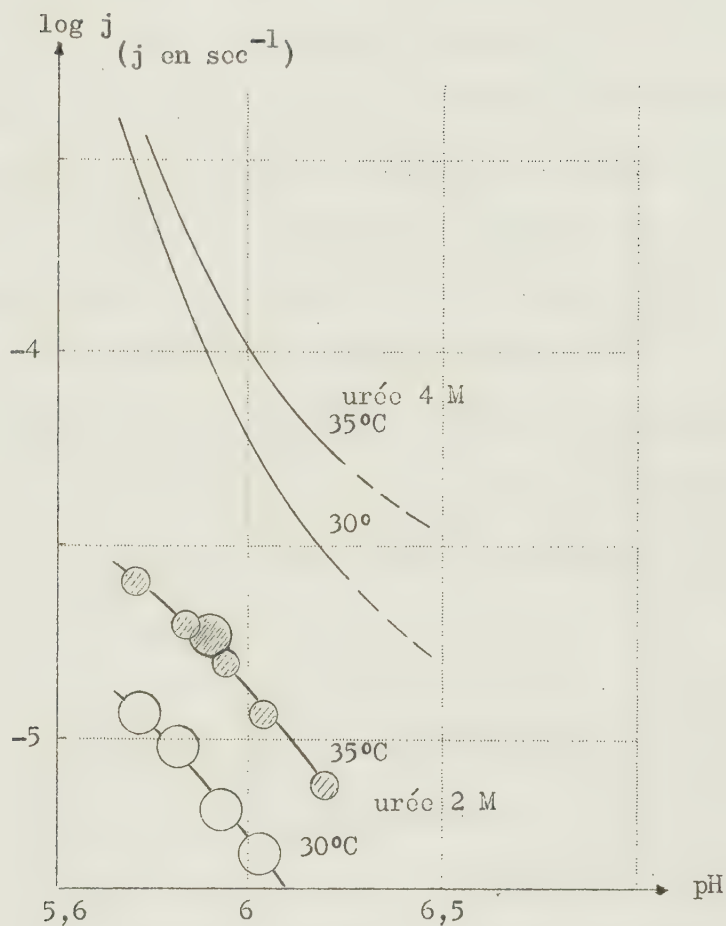


Figure 16.

Variations en fonction du pH de la constante de vitesse de disparition de la méthémoglobine (forme lente), en présence d'urée 2 M (pH compris entre 6,2 et 5,7).

En ordonnées : $\log j$.

En abscisses : pH.

Points blancs: 30°C.

Points grisés: 35°C.

Courbes sans points: rappel des résultats obtenus en urée 4 M dans les mêmes conditions expérimentales.

que A_2 contribue de façon notable à la vitesse globale observée.

L'analyse de la courbe $\log j = f(\text{pH})$ en urée 2 M conduit à une valeur de pK_2 située vers pH 5,3 ; il est possible que ce pK soit celui mis en évidence par différents auteurs (15, 21, 49) ; il correspondrait, d'après les données rapportées par Wyman (47), à une chaleur d'ionisation de l'ordre de 7 000 cal/mol (imidazole). Si nous adoptons cette valeur pour ΔH_2 , il nous est possible d'apprécier l'enthalpie d'activation $\Delta H_2^* = \Delta H^* + \Delta H_2$ (p.53), soit $\Delta H_2^* \approx 35$ à 40 000 calories.

L'identité des énergies d'activation expérimentales (peu différentes des enthalpies d'activation) en urée 2 M et en urée 4 M, à pH 7,2 comme aussi au voisinage de pH 6,5, nous suggère qu'une variation de la concentration en urée ne modifie pas l'enthalpie d'activation des formes A_2 , A_3 , A_4 ; elle modifierait seulement leur entropie d'activation (environ 3 à 4 unités, lorsque l'on passe d'une concentration 2 M à une concentration 4 M, puisque les constantes de vitesse sont multipliées par 6 à 7 environ).

L'équilibre d'ionisation $A_1 \rightleftharpoons A_2 + H^+$ qui se manifeste seulement en urée 4 M correspond vraisemblablement à l'équilibre d'ionisation d'un groupe carboxyle ; on a vérifié (par titrage d'acides carboxyliques) que le pK d'un tel groupe est élevé par une augmentation de concentration en urée - environ 0,2 unité de pH lorsque l'on passe d'une concentration 2 M à une concentration 4 M en urée - la forme A_1 apparaîtrait ainsi à un pH moins acide en urée 4 M. Il est possible aussi

que la présence d'urée 4 M démasque de nouveaux carboxyles ^x, par rupture de liaisons hydrogène ; cette explication pourrait rendre compte de la très faible valeur de l'énergie d'activation expérimentale (μ de l'ordre de 10 000 cal/mol) en urée 4 M, vers pH 5,7 :

l'enthalpie d'activation est $\Delta H^x = \Delta H_1^x - (\Delta H_2 + \Delta H_1)$;

l'allègement ($\Delta H_2 + \Delta H_1$) apporté à ΔH_1^x par les deux rétrogradations d'ionisation, $A_3 + H^+ \longrightarrow A_2$, $A_2 + H^+ \longrightarrow A_1$, ne dépasse pas 10 000 calories par mole et c'est là une limite certainement très supérieure ; il en résulte que ΔH_1^x , enthalpie d'activation de la forme A_1 , est nettement inférieure à 20 000 cal/mol, valeur beaucoup plus faible que les enthalpies d'activation de A_2 et de A_3^{xx} .

^x

Voir études de Steinhardt et Zaiser sur le rôle joué par la rétrogradation de l'ionisation de quelques carboxyles (2 à 3) lors de la dénaturation de ^{la} méthémoglobine de cheval, à pH inférieur à 4 (38, 39, 51).

^{xx}

Zaiser et Steinhardt (52) ont déterminé l'enthalpie d'activation de la dénaturation de la méthémoglobine de cheval, à pH $\approx$ 4 ; ils obtiennent une valeur voisine de 16 000 calories/mole.

E - Discussion des résultats de l'étude de l'évolution spectrale de la méthémoglobine humaine en solution tamponnée en présence d'urée.

On peut se proposer d'interpréter les résultats de l'étude cinétique de l'évolution spectrale de la méthémoglobine en présence d'urée à différents pH en la rapportant aux molécules de la méthémoglobine initialement présentes dans la solution.

Nous avons effectué des mesures de vitesse de sédimentation de la méthémoglobine humaine en l'absence d'urée et en présence d'urée 4 M. En l'absence d'urée, la valeur de la constante de sédimentation (rapportée à l'eau, à la température de 20°C) est $4,2 \cdot 10^{-13}$ sec.; en présence d'urée 4 M, elle est égale à $2,7 \cdot 10^{-13}$ sec (valeur rapportée pareillement à l'eau, à 20°C) ; cette valeur reste constante, lors de l'évolution spectrale de la méthémoglobine. Ces résultats conduisent à penser que la molécule de méthémoglobine est scindée en deux, en présence d'urée 4 M (v.Steinhardt (37)). On peut admettre que les deux moitiés sont identiques et renferment chacune deux hèmes (l'étude de la diffraction des rayons X par la molécule de méthémoglobine - v. Perutz (33) - met en évidence une symétrie qui rend extrêmement probable la possibilité d'une telle coupure).

L'hypothèse provisoire que nous avons utilisée jusqu'à présent (p.25) consiste à admettre que l'évolution spectrale d'une molécule de méthémoglobine - c'est-à-dire dans l'urée 4 M, une molécule contenant deux hèmes - se fait en deux stades, "hème par hème", de façon

parfaitement indépendante. Suivant cette hypothèse, il se trouve donc dans la solution trois sortes de molécules : des molécules intactes (A), des molécules à demi-transformées (C), des molécules complètement transformées (D). Les modifications du spectre d'absorption s'interprètent alors en admettant l'existence d'une forme spectrale intermédiaire, C, entre la forme initiale A et la forme finale B ; les concentrations en formes spectrales A, B, C, représentent les concentrations en molécules (A), (B), (C).

Le spectre des molécules (C) est tel que le coefficient d'absorption sur chaque longueur d'onde soit la moyenne arithmétique des coefficients d'absorption relatifs aux molécules (A) et (B) : $\gamma = \frac{\alpha + \beta}{2}$, ce qui correspond à $p = 1/2$, dans l'expression plus générale donnant le coefficient d'absorption γ d'une forme spectrale intermédiaire C, en fonction des coefficients d'absorption α et β de la forme spectrale initiale A et de la forme spectrale finale B, dans le cas d'une transformation spectralement simple (p.21).

Si a et c sont les concentrations en molécules (A) et (C), la concentration apparente a' en forme spectrale initiale est alors, comme on l'a établi p.21, $a' = a + \frac{c}{2}$. On peut montrer que la constante de vitesse de transformation spectrale observée, $j = -\frac{da'}{dt} \times \frac{1}{a'}$, est égale à la constante de vitesse de transformation des molécules (C) en molécules (B), tandis que la constante de vitesse de transformation des molécules (A) en molécules (C) est double, ce qui s'explique, car la probabilité de transformation de cette molécule est deux fois plus grande.

L'analyse des résultats que nous avons obtenus lors de l'étude de l'évolution spectrale de la méthémoglobine en présence d'urée, n'est pas en désaccord - à la précision que comportent les expériences - avec l'hypothèse d'une transformation de la molécule de méthémoglobine en deux stades "hème par hème" de façon indépendante.

Néanmoins, il est possible d'envisager une autre hypothèse ; on peut supposer que la transformation d'une molécule de méthémoglobine en présence d'urée se fait d'un seul coup sans qu'il se forme de molécule intermédiaire du type (C) à durée de vie notable. La constante de vitesse d'évolution spectrale observée est alors la constante de vitesse de transformation des molécules (A) en molécules (B). Cette deuxième hypothèse peut sembler plus conforme à certains caractères que présentent en général les transformations subies par les protéines sous l'action de l'urée ou d'autres agents dénaturants : dans de nombreux cas, ces transformations apparaissent en effet comme des réactions de "tout ou rien" (1, 50).

Examinons dans le cadre de cette nouvelle hypothèse les variations de vitesse d'évolution spectrale en présence d'urée 4 M, lorsque le pH varie entre 7 et 8. Nous admettrons comme précédemment que l'ionisation ($pK \approx 8,2$) augmente notablement la fragilité de la molécule. Une molécule de méthémoglobine en présence d'urée 4M contient deux hèmes, elle est donc susceptible de subir deux fois cette ionisation. Dans l'expression de la vitesse globale observée, il y aura donc lieu de faire intervenir les constantes de vitesse j'_4 et j''_4 des molécules une fois et deux fois ionisées ; cette ionisation se fait de façon indépendante sur les deux hèmes

(v.h.24,25), on peut évaluer les proportions des différentes formes ionisées à un pH donné et l'expression de la constante de vitesse j observée entre pH 7 et pH 8 prend alors la forme :

$$j = \frac{2 j'_4 \frac{K_3}{h} + j''_4 \frac{K_3^2}{h^2}}{1 + 2 \frac{K_3}{h} + \frac{K_3^2}{h^2}} .$$

Il est raisonnable de supposer que la constante de vitesse j''_4 a une valeur double de la constante de vitesse j'_4 (pour une raison de probabilité). L'expression de j peut alors s'écrire :

$$j = \frac{2 j'_4 \frac{K_3}{h} \left(1 + \frac{K_3}{h} \right)}{1 + 2 \frac{K_3}{h} + \frac{K_3^2}{h^2}} .$$

Tant que K_3/h est petit vis à vis de 1, l'expression de j se simplifie et peut s'écrire :

$$j = 2 j'_4 \frac{K_3}{h} ,$$

Il existe un domaine de pH pour lequel j est sensiblement proportionnel à l'inverse de l'activité en ions H^+ . Cette deuxième hypothèse rend donc compte comme la précédente de la portion de la courbe expérimentale $\log j = f(\text{pH})$ comprise entre pH 7 et pH 7,7.

Au delà de pH 7,7, il n'est plus possible de négliger K_3/h vis à vis de 1. Si l'on calcule l'écart que présente $\log j$ à la loi linéaire, $\log J = \log (2 j'_4) + \text{pH} - \text{p}K_3$, on obtient pour une différence $(\text{pH} - \text{p}K_3)$ donnée, des valeurs $(\log J - \log j)$ sensible-

ment égales à celles auxquelles conduisait la première hypothèse (indépendance des hèmes), tant que la différence ($pK_3 - pH$) reste supérieure à 0,2.

L'étude de l'évolution spectrale de la méthémoglobine laisse donc le choix entre deux hypothèses : transformations indépendantes et successives des deux moitiés de méthémoglobine renfermant chacune un hème, ou au contraire transformation pratiquement simultanée commandée cependant par une réaction qui se produit au voisinage de l'un des hèmes. C'est à cette réaction que se rapportent les énergies d'activation mesurées.

L'étude du potentiel d'oxydo-réduction hémoglobine-méthémoglobine - dans des conditions identiques à celles où l'on a suivi l'évolution spectrale de la méthémoglobine - donnera, comme nous le verrons, la possibilité de choisir entre les deux hypothèses.

II . Hémoglobine

Nous indiquerons pour mémoire quelques résultats relatifs au comportement de l'hémoglobine vis à vis de l'urée. Nous n'avons mis en évidence aucune modification spectrale de l'hémoglobine dans les conditions expérimentales où nous avons étudié la méthémoglobine (solutions tamponnées dont le pH est compris entre 5,7 et 8, en l'absence d'urée ou en présence d'urée à concentration inférieure à 4,5 M, entre 20°C et 40°C).

Mais si l'on réduit par l'hydrosulfite de sodium une solution de méthémoglobine qui a évolué en présence d'urée 4 M, jusqu'à disparition complète de la forme initiale, le spectre d'absorption de la solution obtenue présente deux bandes d'absorption aiguës, l'une très intense dont le maximum se situe vers 560 m μ , l'autre moins intense dont le maximum se situe vers 535 m μ ; ces bandes sont caractéristiques d'un hémochromogène. Le spectre d'absorption de la solution évolue rapidement (fig. 17) (évolution pratiquement terminée en deux heures en présence d'urée 4 M), les deux bandes s'éteignent, le spectre en fin d'évolution présente une bande unique dont le maximum est situé vers 560 m μ . Il existe une longueur d'onde (570 m μ environ) pour laquelle la densité optique demeure sensiblement constante au cours de l'évolution, et les variations

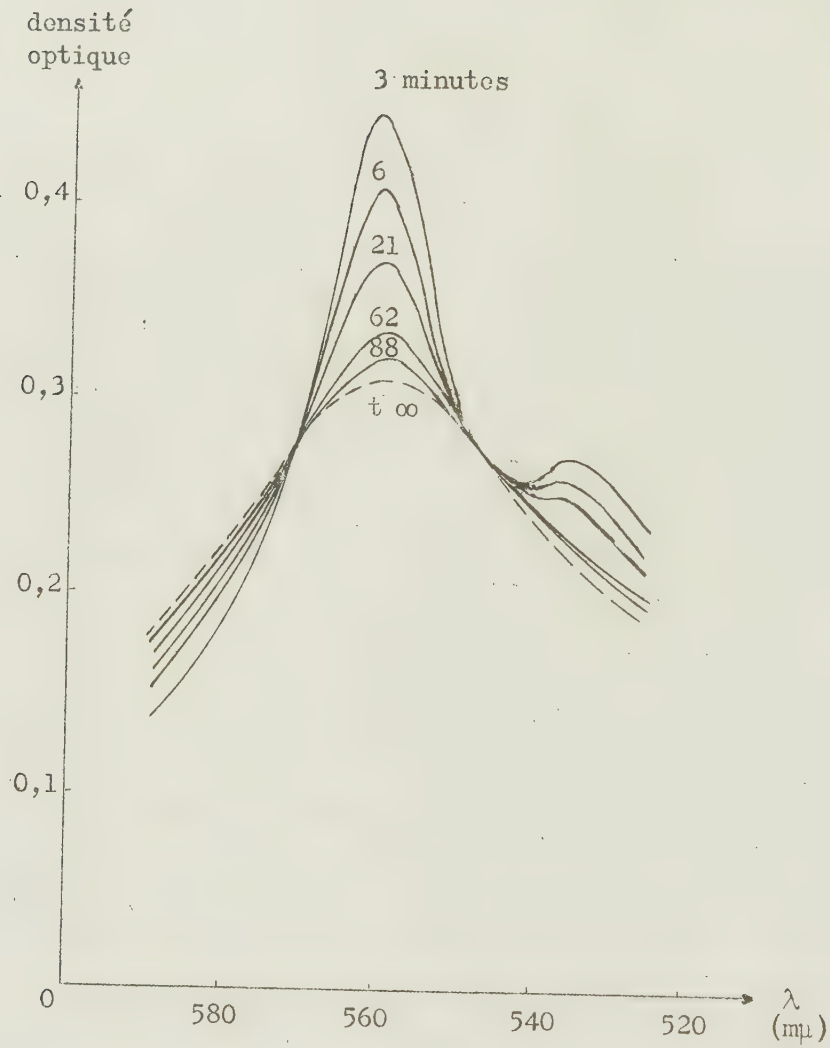


Figure 17.

Evolution, en présence d'urée 4 M, du spectre d'absorption de l'hémochromogène, obtenu par réduction de la méthémoglobine évoluée.

de densité optique sur les différentes longueurs d'onde restent dans des rapports constants. Il est possible dans ces conditions d'interpréter l'évolution spectrale comme la transformation d'une forme spectrale initiale en une forme spectrale unique (p.16). Le spectre final est celui de l'hémoglobine : en agitant la solution à l'air, on voit apparaître les bandes caractéristiques de l'oxyhémoglobine, d'autre part si l'on ajoute à la solution du ferricyanure de potassium, il apparaît la bande d'absorption dans le rouge (maximum 635 mμ) caractéristique de la méthémoglobine, cette bande disparaît ensuite très rapidement, la méthémoglobine formée est donc très fragile. Il est possible de doser spectralement la forme initiale et la forme finale, et d'étudier la cinétique de la réaction. Elle est d'ordre deux. La température n'a pas d'influence sensible sur sa constante de vitesse, cette réaction ne présente pas d'énergie d'activation mesurable.

Notons qu'en présence d'urée plus concentrée (6 à 7 M) on observe l'évolution du spectre de l'hémochromogène vers le spectre de l'hémine réduite, suivant une réaction du premier ordre.

° °
°

DEUXIEME PARTIE :

POTENTIELS D'OXYDO-REDUCTION

I . Rappel de quelques généralités.

Si l'on plonge une électrode inerte (métal "noble" : platine, or) dans une solution contenant certaine proportion des formes réduite et oxydée d'un système oxydo-réducteur, on constate que le potentiel de cette électrode, mesuré par rapport à une électrode de référence reliée à la solution par une jonction liquide, prend une valeur bien déterminée : cette valeur dépend du système considéré et des proportions des formes réduite et oxydée. Le potentiel de cette électrode est mesuré par rapport à l'électrode normale à hydrogène. Il est compté positivement lorsque l'électrode normale à hydrogène est le pôle négatif de la pile constituée par ces deux électrodes.

On montre que, pour un système où le passage de la forme réduite à la forme oxydée se fait par la perte d'un électron, le potentiel E a la valeur :

$$(1) \quad E = E'_O + \frac{RT}{\mathcal{F}} \ln \frac{(Ox)}{(Red)}$$

R, constante des gaz parfaits (8,32 joules par degré)

T, température absolue

$\mathcal{F}$, charge de l'électron-gramme, soit 96 500 cculombs

ln, symbole des logarithmes népériens ($\ln = 2,3 \log$ décimal).

(Red) et (Ox) représentent en toute rigueur les activités des formes réduite et oxydée, que l'on peut en général confondre avec les concentrations ; si l'on désigne par x le taux d'oxydation

($x = \frac{(Ox)}{(Red) + (Ox)}$) l'équation (1) peut s'écrire sous la forme :

$$(1') \quad E = E'_O + \frac{RT}{\mathcal{F}} \ln \frac{x}{1-x} ,$$

E'_O est le potentiel de demi-oxydation, caractéristique du système considéré ; si le passage de la forme réduite à la forme oxydée libère des ions H^+ , ou si les formes réduite et oxydée ne sont pas également ionisées, le potentiel de demi-oxydation E'_O dépend du pH.

Expérimentalement, le titrage de la forme réduite par un agent oxydant donne E en fonction de x, taux d'oxydation. La courbe de titrage ainsi obtenue est en général une courbe en S, dont le point d'inflexion correspond à la demi-oxydation. Si l'on représente les variations de $(E - E'_O)$ en fonction de $\log \frac{x}{1-x}$, on obtient une droite D.

Lorsque le passage de la forme réduite à la forme oxydée se fait par perte d'un seul électron (c'était le cas théorique précédemment envisagé), la pente de la droite D est, à 30°C, de 60 mV

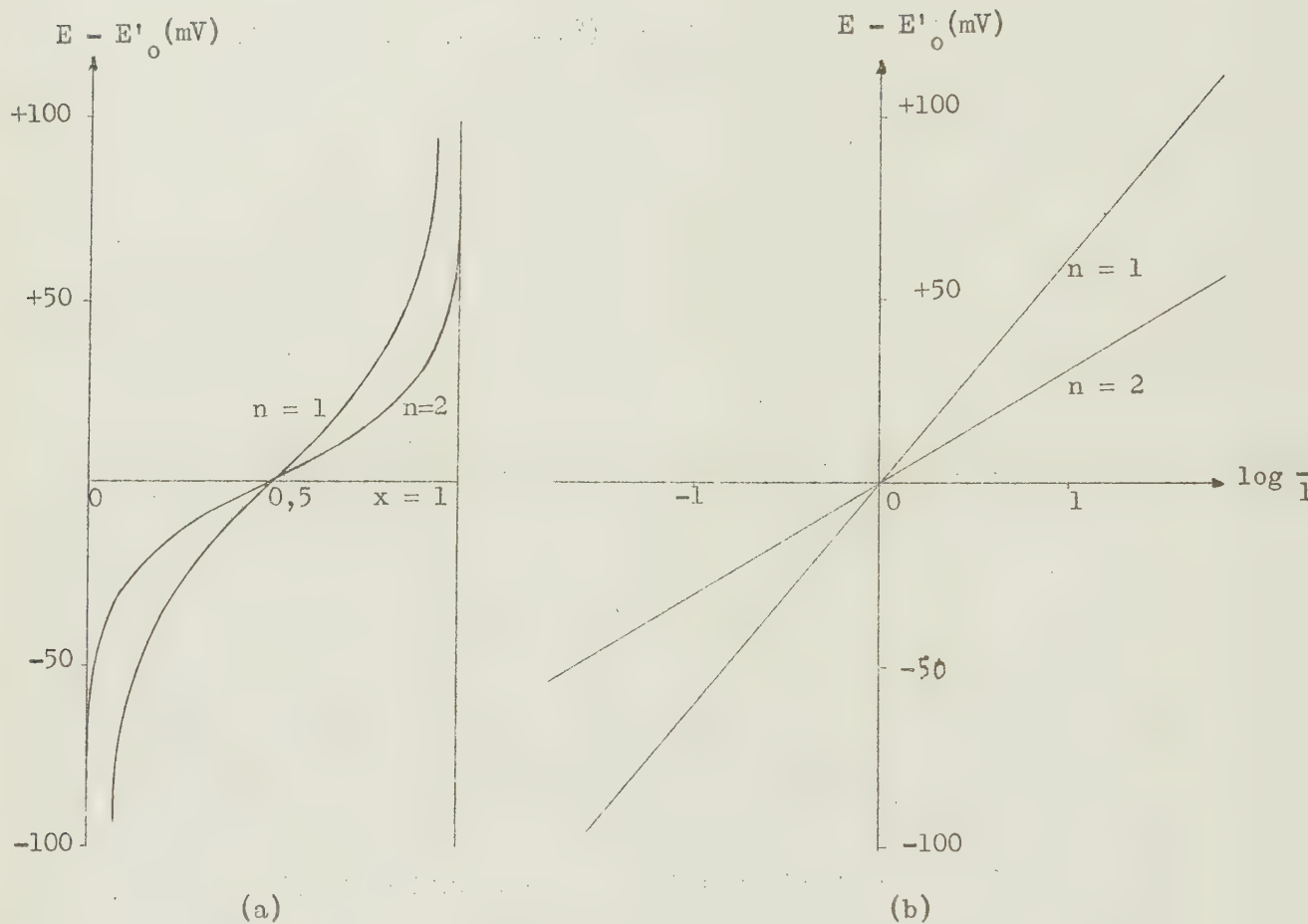


Figure 18.

Variations avec le taux d'oxydation du potentiel E de systèmes oxydo-réducteurs à 1 électron et à 2 électrons (courbes théoriques).

Fig. 18 a : en ordonnées, $(E - E'_0)$.
en abscisses, x .

Fig. 18 b : en ordonnées, $(E - E'_0)$.
en abscisses, $\log \left(\frac{x}{1-x} \right)$.

(E'_0 , potentiel de demi-oxydation; x , taux d'oxydation).

($2,3 RT/F = 60 \text{ mV}$). On peut écrire :

$$E \text{ (volts)} = E'_O + 0,060 \log \frac{x}{1-x} \quad (\text{Fig.18}).$$

Lorsque le passage de la forme réduite à la forme oxydée se fait par perte de deux électrons, ce qui est le cas de nombreuses oxydo-réductions organiques, on peut prévoir théoriquement que la pente de la droite sera $2,3 RT/2F = 30 \text{ mV}$, et c'est ce que l'on trouve généralement. On peut écrire alors :

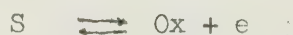
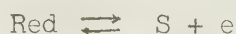
$$E \text{ (volts)} = E'_O + 0,030 \log \frac{x}{1-x} \quad (\text{Fig.18}).$$

Mais il peut arriver que la courbe de titrage soit une courbe intermédiaire entre les deux courbes précédentes, la représentation graphique des variations de $(E - E'_O)$ en fonction de $\log \frac{x}{1-x}$ est souvent alors une droite (au moins dans un large domaine de variations de x) : la pente de cette droite est comprise entre 60 et 30 mV, on peut écrire :

$$E \text{ (volts)} = E'_O - \frac{0,060}{n} \log \frac{x}{1-x},$$

n est appelé le nombre apparent d'électrons en jeu dans l'oxydo-réduction considérée ; n peut être entier ou fractionnaire.

Lorsque n n'est pas entier, on peut interpréter les faits en admettant que l'oxydation de la forme réduite se fait en deux stades, par la perte non simultanée des deux électrons (raisonnement de Michaelis sur les semiquinones) :



la courbe de titrage observée correspondrait aux titrages successifs et plus ou moins enchevêtrés de Red, puis de S.

Désignons par E_1 et E_2 les potentiels de demi-oxydation globale des systèmes Red-S d'une part, S-Ox d'autre part. Le potentiel d'équilibre de ces trois corps, aux concentrations molaires respectives (Red), (S), (Ox), a la valeur E :

$$E = E_1 + \frac{RT}{\mathcal{F}} \ln \frac{(S)}{2(\text{Red})} = E_2 + \frac{RT}{\mathcal{F}} \ln \frac{2(\text{Ox})}{(S)},$$

$$E = \frac{E_1 + E_2}{2} + \frac{RT}{2\mathcal{F}} \ln \frac{(\text{Ox})}{(\text{Red})}.$$

A la demi-oxydation globale de l'ensemble, pour laquelle

$$2(\text{Red}) + (\text{S}) = 2(\text{Ox}) + (\text{S}), \text{ soit } (\text{Red}) = (\text{Ox}),$$

le potentiel a la valeur $E_0 = (E_1 + E_2)/2$.

Pour un taux d'oxydation x ($x = \frac{2(\text{Ox}) + (\text{S})}{2[(\text{Red}) + (\text{Ox}) + (\text{S})]}$),

$$\text{nous avons vu que } E = E_0 + \frac{RT}{n\mathcal{F}} \ln \frac{x}{1-x},$$

$$\text{soit : } E = E_0 + \frac{RT}{n\mathcal{F}} \ln \frac{2(\text{Ox}) + (\text{S})}{2(\text{Red}) + (\text{S})}.$$

Si les deux groupes oxydables correspondant aux deux stades d'oxydation sont identiques et s'il n'y a pas d'interaction entre ces deux groupes, $E_1 = E_2$, ce qui entraîne :

$$\frac{2(\text{Red})}{(\text{S})} = \frac{(\text{S})}{2(\text{Ox})} = \frac{2(\text{Red}) + (\text{S})}{2(\text{Ox}) + (\text{S})};$$

on voit facilement dans ces conditions que $n = 1$, dans l'équation ci-dessus.

Si au contraire l'oxydation du premier groupe facilite grandement l'oxydation du deuxième, la concentration en S sera toujours très faible (S ne sera pas plus tôt formé qu'il sera oxydé), le

rapport $\frac{2(\text{Red}) + (\text{S})}{2(\text{Ox}) + (\text{S})}$ sera sensiblement égal à $\frac{(\text{Red})}{(\text{Ox})}$, et la valeur de n sera 2. Le potentiel E_2 est alors beaucoup plus bas que le potentiel E_1 , et l'interaction est très grande.

L'énergie libre d'interaction entre les groupes, ΔF , est mesurée par la différence entre les deux potentiels E_1 et E_2 ,

$$\Delta F = \mathcal{F} (E_1 - E_2) ;$$

On pose $\Delta F = + RT \ln \alpha$, α est le facteur d'interaction. On peut calculer n en fonction de α ; on obtient l'expression :

$$n = \frac{2 \sqrt{\alpha}}{\sqrt{\alpha} + 1} .$$

Calcul de n en fonction de α

$$E_1 - E_2 = \frac{RT}{\mathcal{F}} \ln \alpha .$$

or
$$E_1 - E_2 = \frac{RT}{\mathcal{F}} \ln \frac{4(\text{Red})(\text{Ox})}{(\text{S})^2} ,$$

soit
$$\alpha = \frac{(\text{S})^2}{4(\text{Red})(\text{Ox})} ,$$

$$(\text{S}) = 2 \sqrt{(\text{Red})(\text{Ox})} \sqrt{\alpha} .$$

or
$$\frac{RT}{2\mathcal{F}} \ln \frac{(\text{Red})}{(\text{Ox})} = \frac{RT}{n\mathcal{F}} \ln \frac{2(\text{Red}) + (\text{S})}{2(\text{Ox}) + (\text{S})} ,$$

donc
$$\frac{n}{2} = \frac{\ln \frac{2(\text{Red}) + (\text{S})}{2(\text{Ox}) + (\text{S})}}{\ln \frac{(\text{Red})}{(\text{Ox})}} .$$

Evaluons n au voisinage de la valeur particulière $\frac{(\text{Red})}{(\text{Ox})} = 1$:

$$\frac{(\text{Red})}{(\text{Ox})} = 1 + \varepsilon, \quad \ln \frac{(\text{Red})}{(\text{Ox})} \approx \varepsilon$$

$$\frac{2(\text{Red}) + (\text{S})}{2(\text{Ox}) + (\text{S})} = \frac{2(\text{Red}) + 2\sqrt{\alpha} \sqrt{(\text{Red})(\text{Ox})}}{2(\text{Ox}) + 2\sqrt{\alpha} \sqrt{(\text{Red})(\text{Ox})}},$$

soit
$$\frac{2(\text{Red}) + (\text{S})}{2(\text{Ox}) + (\text{S})} = \frac{1 + \varepsilon + \sqrt{\alpha} (1 + \varepsilon/2)}{1 + \sqrt{\alpha} (1 + \varepsilon/2)},$$

$$\frac{2(\text{Red}) + (\text{S})}{2(\text{Ox}) + (\text{S})} \approx 1 + \varepsilon \frac{\sqrt{\alpha}}{\sqrt{\alpha} + 1},$$

$$\ln \frac{2(\text{Red}) + (\text{S})}{2(\text{Ox}) + (\text{S})} \approx \frac{\varepsilon \sqrt{\alpha}}{\sqrt{\alpha} + 1},$$

d'où l'on déduit :
$$n = \frac{2 \sqrt{\alpha}}{\sqrt{\alpha} + 1}.$$

II . Techniques générales de mesure des potentiels d'oxydo-réduction.

On mesure par la méthode d'opposition la force électromotrice (f.e.m.) E_{obs} d'une pile dont l'un des compartiments est l'électrode de référence, l'autre compartiment la solution oxydo-réductrice dans laquelle plonge une électrode de platine poli ; les deux compartiments sont reliés par une jonction liquide (chlorure de potassium en solution saturée immobilisée par de la gélose).

L'électrode de référence pratique que nous avons utilisée est l'électrode au calomel saturée en chlorure de potassium. On la main-

tient continuellement à la température à laquelle on désire l'utiliser. Nous disposions de plusieurs électrodes au calomel, en accord les unes avec les autres, à mieux que 1 mV près ; après avoir vérifié cet accord, nous les avons maintenues respectivement aux températures où nous nous proposons de les utiliser, afin qu'elles soient toujours en équilibre ; nous avons adopté pour le potentiel de l'électrode à calomel par rapport à l'électrode normale à hydrogène la valeur suivante aux différentes températures :

$$E_c = 0,250 \text{ volt} - 0,00065 (t-18),$$

où t représente la température centésimale (36) ; le potentiel E par rapport à l'électrode normale à hydrogène est :

$$E = E_{\text{obs}} + E_c.$$

L'ensemble de la pile doit se trouver à une température bien déterminée ; nous l'avons placée dans un thermostat à eau dont la température était connue et maintenue constante à 2 dixièmes de degré près. On veillait à isoler électriquement l'intérieur de la pile de l'eau du thermostat.

Il est important que la pile ne débite pratiquement pas, dans les tâtonnements qui précèdent l'opposition exacte. L'appareil de zéro qui permet de vérifier l'opposition doit donc être du type électromètre. Nous avons utilisé le potentiomètre de Jouan, monté en millivoltmètre. La précision atteinte est de l'ordre de 1 mV.

Les électrodes de platine sont soigneusement lavées à l'eau régale, rincées à l'eau bidistillée, et portées juste avant l'utilisation dans la partie oxydante de la flamme d'une veilleuse de bec Bunsen. On fait plonger dans la solution oxydo-réductrice 2 électrodes de pla-

tine et on ne retient leurs indications que si elles ne diffèrent pas de plus de 2 à 5 mV.

La mise en équilibre des électrodes est parfois lente, on a affaire alors à un système peu électroactif, on peut hâter cette mise en équilibre en ajoutant à la solution une faible quantité d'un corps oxydo-réducteur très électroactif ("intermédiaire" électroactif) ; l'intermédiaire se met en équilibre avec le système et avec l'électrode, et l'on obtient rapidement un potentiel stable ; si la quantité d'intermédiaire est petite, il ne modifie pratiquement pas les proportions des formes réduite et oxydée du système étudié ; le potentiel de l'intermédiaire doit être assez voisin de celui de ce système.

Toutes les mesures doivent être effectuées à l'abri de l'air : soit dans une atmosphère inerte, soit sous vide. On opère ainsi les titrages d'oxydo-réduction sous azote (azote R, fourni par la Compagnie "L'Air Liquide", on le débarrasse des traces d'oxygène qu'il peut contenir en le faisant passer sur du cuivre finement divisé, chauffé à 500 °C environ).

La figure 19 montre le schéma d'un vase à titrage tel que ceux que nous avons utilisés. Avant de commencer le titrage, on balaie soigneusement l'atmosphère du vase, comme les solutions (à titrer et agent de titrage) à l'aide d'azote purifié. L'agent de titrage - supposons que ce soit un oxydant - doit avoir un potentiel de demi-oxydation très différent de celui du système étudié, afin d'être complètement réduit à chaque addition dans la solution à titrer : la quantité d'oxydant ajoutée est alors proportionnelle au taux global d'oxydation x , et l'on peut confondre la courbe de titrage expérimentale et la courbe E

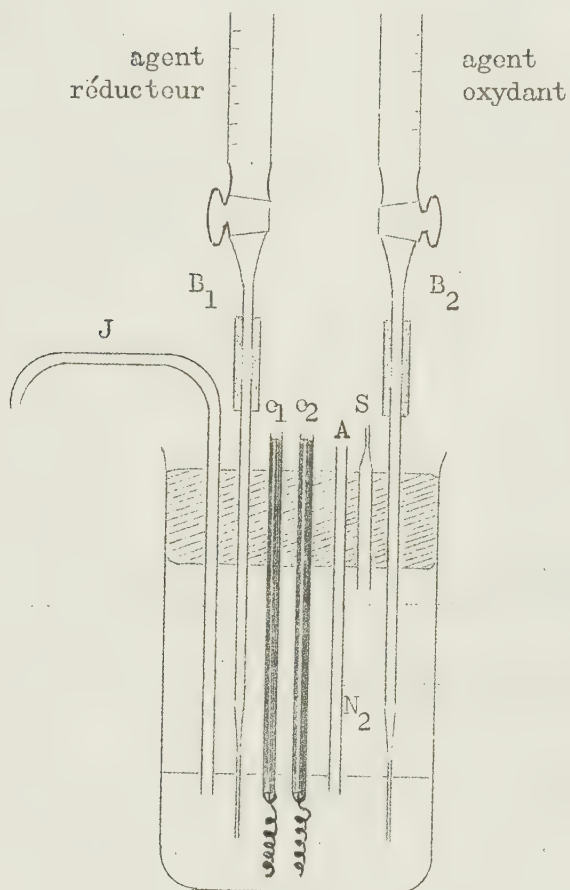


Figure 19.

Vase à titrage d'oxydo-réduction.

J, jonction liquide; B₁, B₂, burettes;

A, S, tubes d'arrivée et de sortie de l'azote;

e₁, e₂, électrodes de platine poli.

fonction de x , précédemment décrite. Les solutions de l'agent de titrage sont préparées dans le même solvant que la solution à titrer (même pH, mêmes concentrations salines, etc.) ; d'autre part, leur concentration est telle que la solution étudiée ne soit pas diluée de plus de 10 % au cours du titrage. On mesure à l'électrode de verre le pH de la solution, en fin de titrage.

Les protocoles d'expérience dont il sera question dans la suite de ce travail tiennent compte de toutes les précautions énumérées ci-dessus.

III . Introduction à l'étude du potentiel d'oxydo-réduction du système hémoglobine-méthémoglobine.

L'hémoglobine et la méthémoglobine peuvent être en équilibre d'oxydo-réduction. Conant et Coll. (9,10, 11), Conant et Pappenheimer (12) ont été les premiers à étudier ce système oxydo-réducteur ; ils ont déterminé la valeur du potentiel d'oxydo-réduction pour des rapports connus des formes oxydée et réduite, ou encore, par titrage, pour un taux d'oxydation globale donné.

La difficulté de ces déterminations tient au fait que ce système est très faiblement électroactif, la mise en équilibre des électrodes est lente, et leurs indications sont assez peu précises et mal reproductibles. Taylor et Hastings (41) ont obtenu une précision meilleure en effectuant le titrage de l'hémoglobine en présence d'intermédiaires électroactifs convenablement choisis (bleu de toluyène

par exemple).

Ces études montrent en premier lieu que les groupes oxydo-réducteurs responsables de l'équilibre étudié sont les hèmes, car l'oxydation complète de l'hémoglobine en méthémoglobine par le ferri-cyanure de potassium se fait "atome de fer à atome de fer". Elles conduisent à l'équation suivante, qui donne le potentiel E en fonction du taux d'oxydation globale :

$$(1) \quad E = E'_O + \frac{RT}{nF} \ln \frac{x}{1-x} .$$

La mesure directe des concentrations en méthémoglobine et en hémoglobine, d'après le spectre d'absorption, fournit une équation identique :

$$(1') \quad E = E'_O + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(\text{méthémoglobine})}{(\text{hémoglobine})} .$$

La valeur de n, nombre apparent d'électrons en jeu dans cette oxydo-réduction, est comprise entre 1 et 2. Dans un domaine assez large de variations de x, n a une valeur sensiblement constante, voisine de 1,6 (12, 41).

Nous l'avons personnellement vérifié, par titrage de l'hémoglobine humaine en solution tamponnée : la représentation graphique des variations de $(E - E'_O)$ en fonction de $\log \frac{x}{1-x}$ donne sensiblement une droite (fig. 20b) ; les droites obtenues dans des expériences différentes se trouvent à l'intérieur du faisceau hachuré (fig. 21) où nous avons représenté les droites qui correspondent à $n = 1$ et $n = 2$. Les mesures très précises de Taylor et Hastings (41) semblent mettre en évidence une variation de n en cours de titrage ; nous

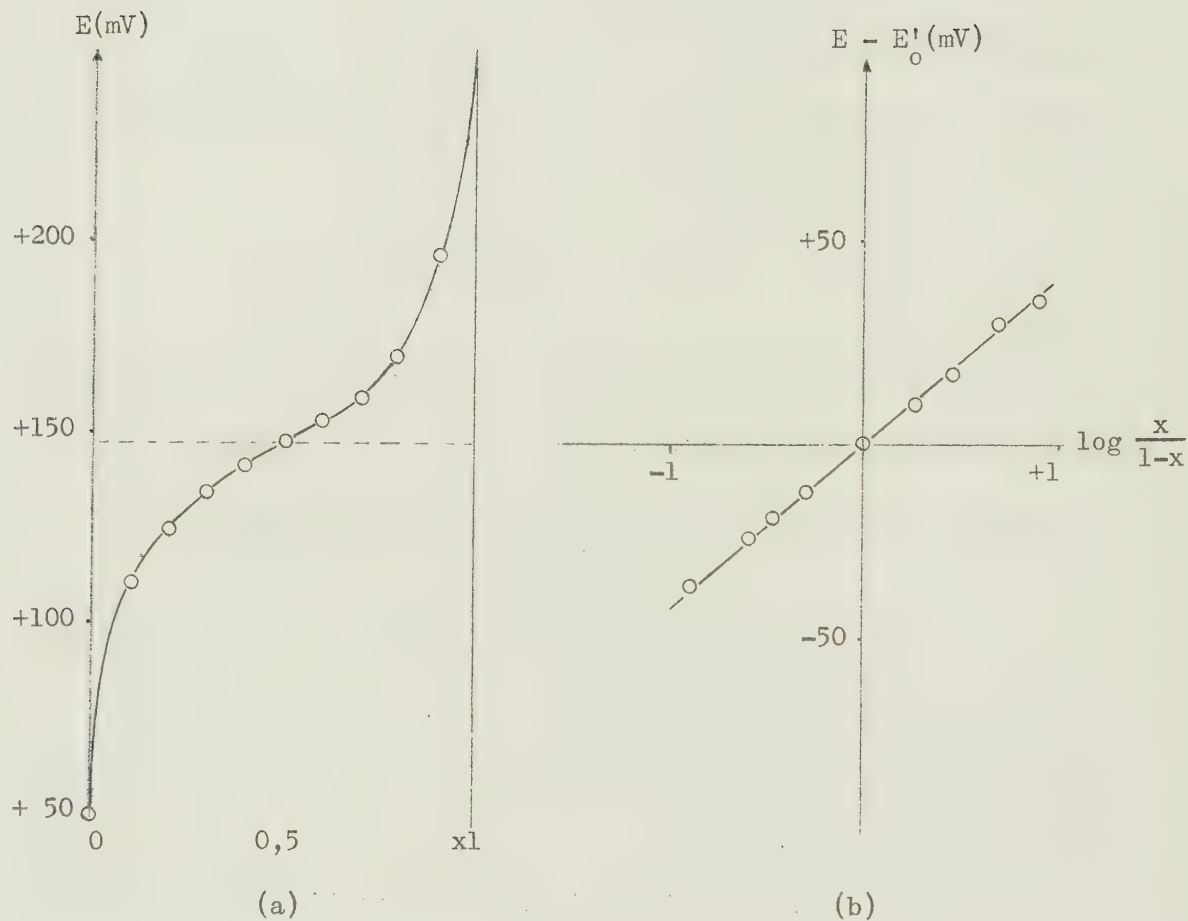


Figure 20.

Variations avec le taux d'oxydation x du potentiel d'oxydo-réduction E du système hémoglobine-méthémoglobine ($\text{pH} \approx 7$).

Figure 20 a : en ordonnées, E (potentiel);
en abscisses, x (taux d'oxydation).

Figure 20 b : en ordonnées, $E - E'_0$;
en abscisses, $\log \frac{x}{1-x}$.

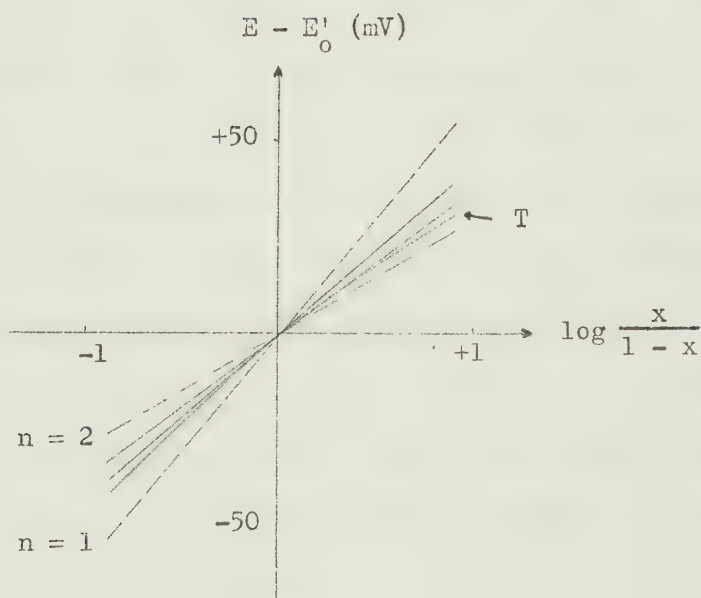


Figure 21.

Détermination du nombre d'électrons en jeu lors de l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine.

En ordonnées: $E - E'_0$.

En abscisses: $\log \frac{x}{1-x}$.

Faisceau hachuré: ensemble de nos résultats expérimentaux ($n \approx 1,6$).

Courbe T: résultats de Taylor.

avons porté leurs résultats, dans le mode de représentation précédent, sur la figure 21, courbe en trait plein (T).

On interprète cette valeur fractionnaire de n en admettant qu'il y a interaction entre les quatre hèmes de la molécule d'hémoglobine, l'oxydation de l'un faciliterait l'oxydation des autres (32, 13) ; pour la molécule de myoglobine qui ne contient qu'un hème par molécule, on trouve en effet $n = 1$ (43). On est amené à penser que les quatre hèmes sont groupés en deux paires dans la molécule d'hémoglobine et que les interactions entre hèmes d'une même paire sont beaucoup plus considérables que les interactions entre ceux de deux paires différentes. En effet, ces interactions ne paraissent pas modifiées sensiblement après coupure de la molécule en deux (47)^x. On peut appliquer à une paire les considérations précédemment développées sur les oxydations bivalentes par stades (Red, S, Ox). On peut alors exprimer l'énergie d'interaction entre hèmes, soit ΔF ($\Delta F = RT \ln \alpha$, α , facteur d'interaction) d'après la valeur de n ($n = 2 \sqrt{\alpha} / (\sqrt{\alpha} + 1)$) ; on obtient la valeur $\Delta F \approx 1800$ cal/mol, pour $n \approx 1,6$.

L'étude de l'équilibre d'oxygénation de l'hémoglobine :



conduit à des résultats analogues. Mais les interactions entre hèmes appartenant aux deux paires différentes sont plus élevées que dans le cas de l'oxydation (voir note^{xx} page suivante).

^x Il faudrait attribuer aux interactions d'une paire sur l'autre les variations de n en cours de titrage (41, 47).

Cependant, d'autres propriétés de l'hémoglobine, liées pour-
tant à l'hème ou à son voisinage immédiat, ne manifestent pas de
telles interactions entre hèmes. Ainsi, l'équation (1), qui donne E
en fonction de x, a la même forme que l'équation (1') qui donne E en
fonction du rapport de concentrations en méthémoglobine et en hémoglo-
bine mesurées spectralement : le spectre d'absorption est donc une
propriété parfaitement additive pour les différents hèmes de la molé-
cule.

La valeur du potentiel de demi-oxydation E'_0 varie avec le pH
l'étude de ces variations (courbe 1 de la figure 22) a permis de dé-
terminer les constantes d'ionisation de certains groupes de l'hémo-
globine et de la méthémoglobine (calculs de Wyman et Ingalls (49),
d'après les résultats expérimentaux de Taylor et Hastings (41)) . les
valeurs obtenues concordent avec celles que fournissent d'autres
méthodes.

Taylor a étudié la modification apportée par l'urée au poten-
tiel du système hémoglobine-méthémoglobine (40) ; ses résultats sont
représentés par la courbe 2 de la figure 22. La présence d'urée
abaisse le potentiel d'oxydo-réduction E'_0 de 50 mV environ, sans modi-
fier sensiblement la loi de variation de ce potentiel avec le pH.

Cette étude de Taylor, qui porte essentiellement sur les hémoglo-
bines de cheval ou de chien, est à l'origine du présent travail.

* * Riggs (34) a montré le rôle des groupes SH dans les inter-
actions entre hèmes qui se manifestent au cours de l'oxygénation de
l'hémoglobine humaine.

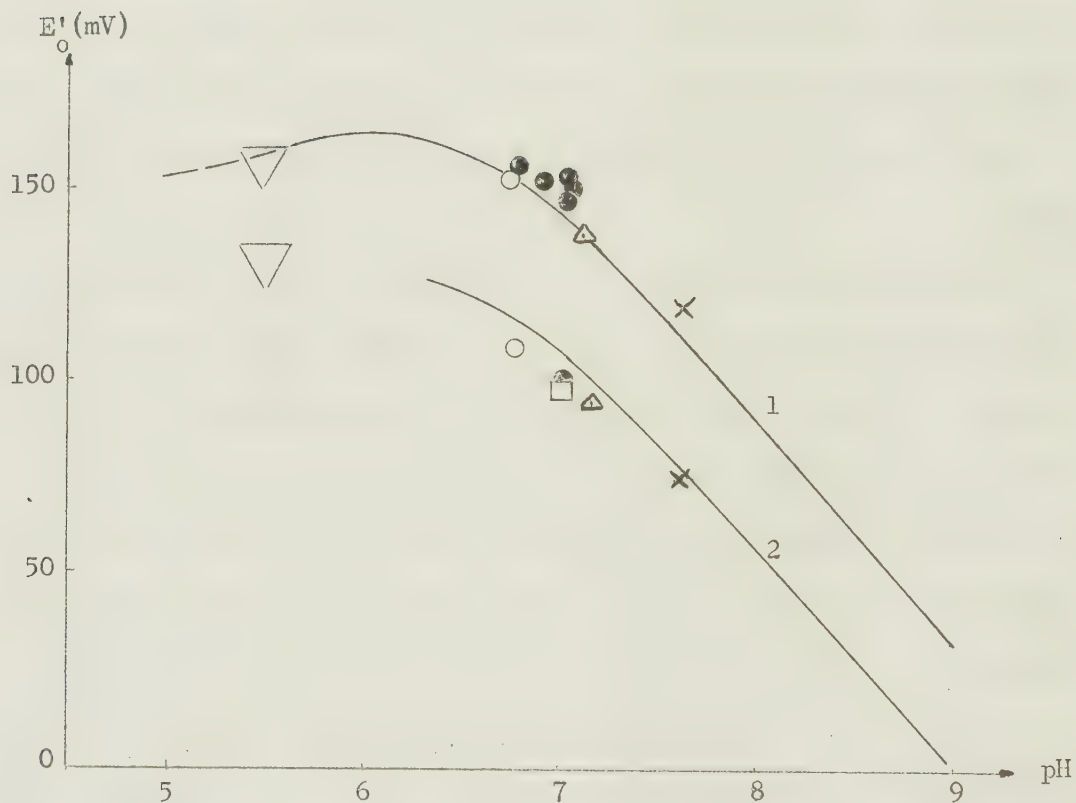


Figure 22.

Variations avec le pH du potentiel de demi-oxydation E'_0 du système hémoglobine-méthémoglobine.

Les courbes en traits pleins 1 et 2 sont tracées d'après les résultats de Taylor: 1, en l'absence d'urée;

2, en présence d'urée 4 M.

Les points correspondent à nos propres résultats:

●, obtenus par titrage;

▽ ○ □ × △, obtenus au cours des études de cinétique d'évolution du potentiel (en tube de Thunberg).

Son extension à l'hémoglobine humaine a soulevé dès l'abord une difficulté : alors que le potentiel correspondant à un taux donné d'oxydation reste stable dans le cas de l'hémoglobine de cheval ou de chien, il évolue en fonction du temps quand il s'agit d'hémoglobine humaine, en présence d'urée. Une telle évolution rendrait illusoire une étude par titrage (technique Taylor (40)) : c'est donc une étude cinétique de cette évolution qui s'imposait. Elle a été faite dans les mêmes conditions que les études cinétiques des modifications spectrales de la méthémoglobine. Elle en a confirmé les résultats et elle a apporté quelques précisions supplémentaires. Elle a permis de mettre en évidence par extrapolation au temps zéro une action de l'urée sur l'hémoglobine et la méthémoglobine humaines, comparable à celle décrite par Taylor (40), et elle nous a conduits à déterminer quelques données thermodynamiques de la réaction correspondante.

D'autre part, nous avons étudié l'équilibre d'oxydo-réduction, en présence d'urée, de la méthémoglobine déjà évoluée dans l'urée et de sa forme réduite. Nous avons cherché s'il était possible de localiser l'effet de l'urée sur la méthémoglobine et l'hémoglobine en examinant si l'urée avait une action sur les équilibres d'oxydo-réduction ferro-ferri hémines, ferro-ferri hémines complexées par l'histidine (on pense en effet que les hèmes sont liés à la globine par l'histidine). Dans ces différents cas, il n'y avait pas d'évolution sensible du potentiel en fonction du temps : il nous a donc été possible d'opérer par titrage.

IV . Potentiel d'oxydo-réduction du système hémoglobine -

méthémoglobine humaines en présence d'urée.

A - Evolution du potentiel correspondant à un taux donné d'oxydation globale.

1° Technique :

L'utilisation d'oxyhémoglobine préalablement moussée m'a permis de mettre en œuvre une technique simple pour suivre l'évolution du potentiel, à un taux donné d'oxydation globale, du mélange constitué initialement par de l'hémoglobine et de la méthémoglobine en proportion connue. J'ai utilisé des tubes de Thunberg à deux compartiments munis de deux électrodes de platine poli et d'un capillaire préalablement rempli de gélose saturée de chlorure de potassium (fig. 23). Dans un des compartiments, on introduit un petit volume de la solution moussée d'oxyhémoglobine, dans l'autre compartiment, une solution tamponnée (tampon phosphates de potassium, chlorure de potassium), additionnée éventuellement d'urée, à laquelle on ajoute du ferricyanure de potassium (oxydant) et du bleu de toluyène (intermédiaire électroactif). Les quantités des différents réactifs sont prévues pour que le volume total de solution après mélange du contenu des deux compartiments soit de 5 cm^3 , un tel volume correspond à la fraction commodément utilisable du volume total du tube de Thunberg. La concentration en protéine de cette solution sera de l'ordre de 0,5 à

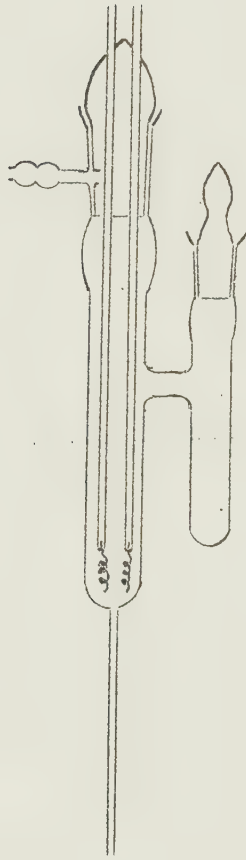


Figure 23.

Tube de Thunberg.

1 milliatome de fer par litre. On graisse les rodages du bouchon et du robinet qui ferment le tube avec une graisse inerte. On relie le tube à la trompe à vide, on le laisse en communication avec la trompe 10 à 15 minutes, en évitant soigneusement le mélange prématuré du contenu des compartiments : l'oxyhémoglobine se transforme en hémoglobine. On ferme le tube, puis on mélange les deux solutions : le ferricyanure de potassium présente une fraction déterminée de l'hémoglobine. On plonge alors le tube dans un bain de chlorure de potassium saturé relié à l'électrode de référence et maintenu comme elle à température constante. On note le potentiel de l'une et l'autre électrodes de platine en fonction du temps.

2° Cinétique de l'évolution du potentiel :

(a) Résultats .

Les figures 24, 25, 26, représentent les variations du potentiel au cours d'expériences effectuées dans des conditions différentes. Ces figures montrent deux périodes dans l'évolution du potentiel :

- (1) Une période pendant laquelle le potentiel décroît très rapidement et où les deux électrodes peuvent présenter de très grands écarts, jusqu'à une centaine de millivolts : c'est la période d'établissement du potentiel (20 à 30 minutes, parfois plus même) ; la stabilisation est beaucoup plus rapide en présence d'urée.
- (2) Une période pendant laquelle le potentiel est défini et reproductible (les électrodes ne diffèrent pas de plus de 5 millivolts) ; pendant cette période, le potentiel reste parfaitement constant en

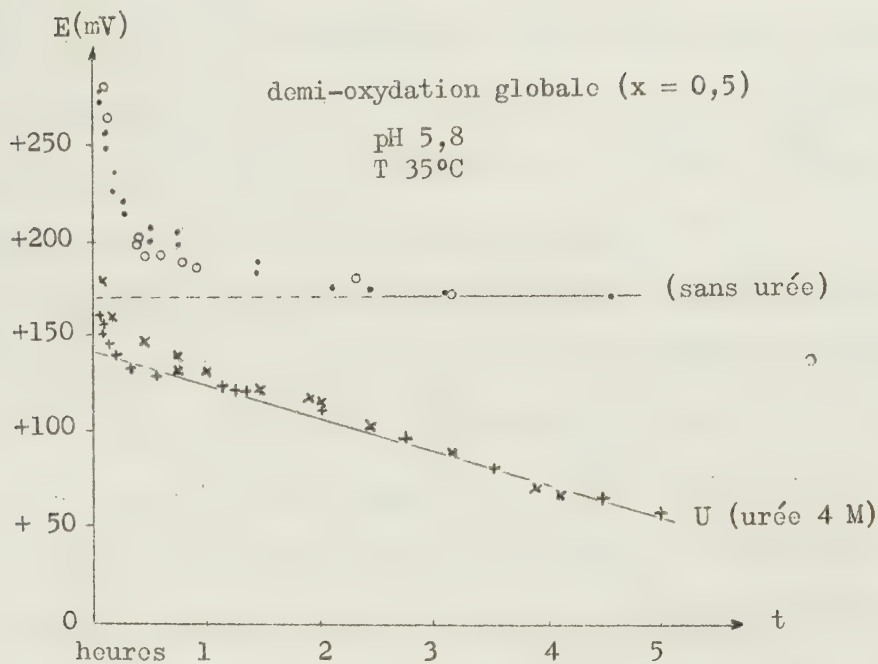


Figure 24.

Evolution, en l'absence ou en présence d'urée, du potentiel d'un mélange hémoglobine-méthémoglobine à demi-oxydation globale (pH 5,8, 35°C , sans urée et en urée 4 M).

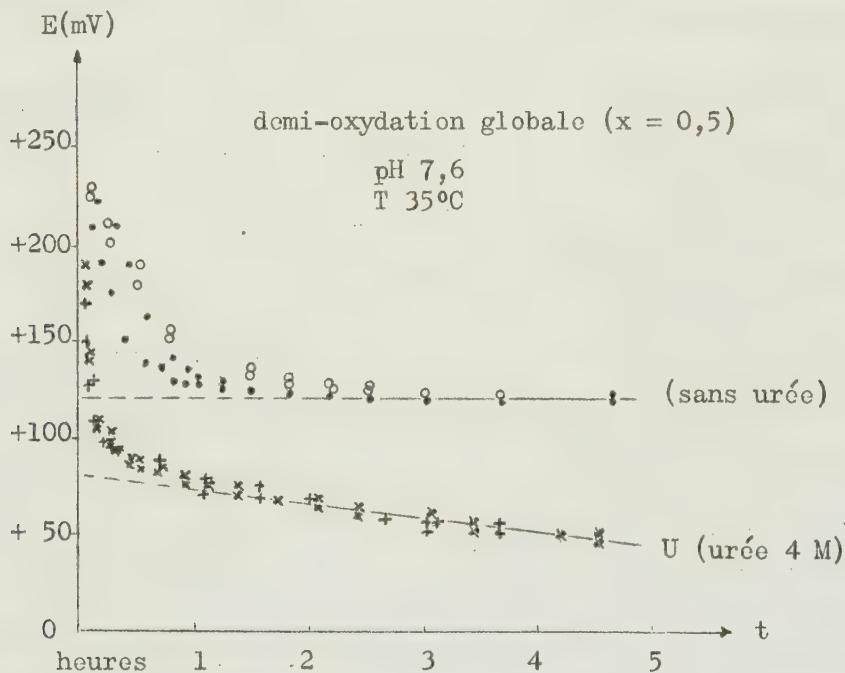


Figure 25.

Mêmes expériences que ci-dessus (fig. 24) mais à pH 7,6.

l'absence d'urée ; en présence d'urée, il décroît linéairement : on peut donc dans chaque cas définir une vitesse constante d'évolution du potentiel comme on avait défini une vitesse constante de disparition de la méthémoglobine lors de l'étude de l'évolution spectrale. Cette vitesse d'évolution du potentiel est indépendante du taux d'oxydation globale, comme le montre la courbe U, 4M, $x \approx 0,1$ de la figure 26. La figure 27 récapitule tous ces résultats, l'origine des potentiels étant prise pour chaque courbe d'évolution du potentiel en fonction du temps au point où la droite d'extrapolation de la partie rectiligne de ces courbes coupe l'axe des ordonnées (temps zéro).

(b) Comparaison des vitesses d'évolution du potentiel et des vitesses d'évolution spectrale de la méthémoglobine, dans des conditions identiques de concentration en urée, de pH, de température.

La comparaison se rapporte à la forme spectrale lente de méthémoglobine, qui constitue la quasi-totalité de la méthémoglobine initiale (plus de 90 %) pour les échantillons utilisés, dans les conditions de concentration mentionnées ci-dessus.

L'étude de l'évolution spectrale à différents pH pour des taux différents d'urée et à différentes températures, permet de connaître les vitesses de variation de concentration en forme spectrale initiale de méthémoglobine, dans les conditions expérimentales où l'on a suivi l'évolution du potentiel.* La figure 28 montre la comparaison

* Nous avons vérifié que la vitesse de disparition spectrale de la méthémoglobine était indépendante du taux d'oxydation correspondant au mélange initial hémoglobine-méthémoglobine.

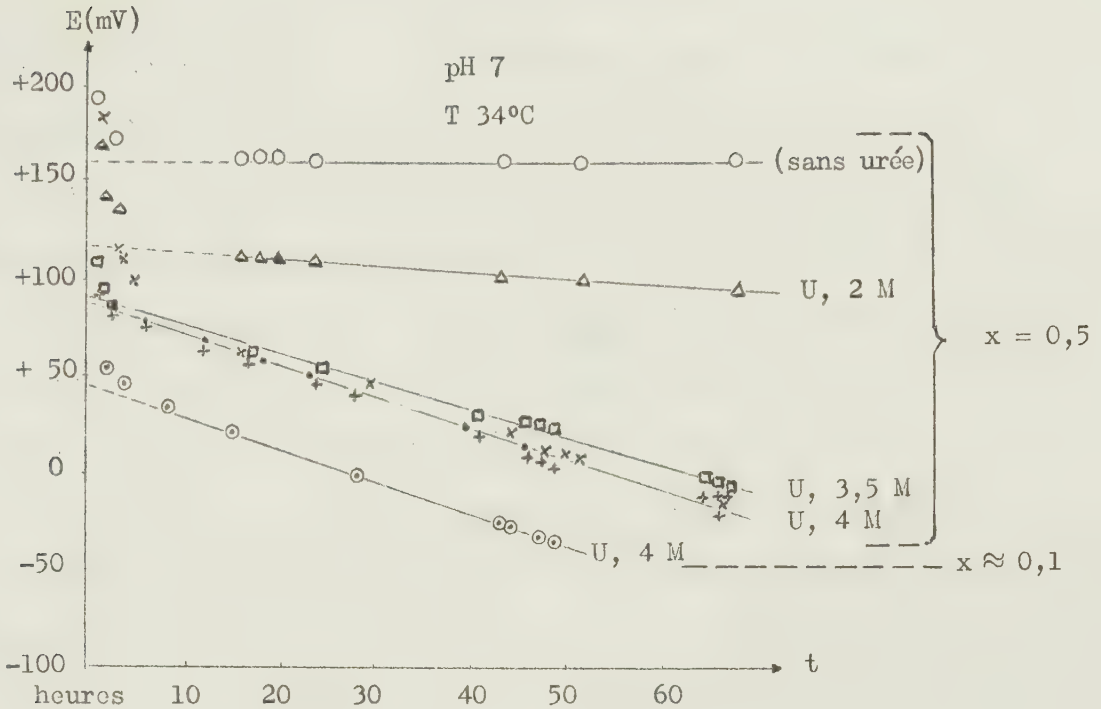


Figure 26.

Evolution, en l'absence ou en présence d'urée, du potentiel d'un mélange hémoglobine-méthémoglobine, pour un taux d'oxydation globale donné (pH 7, 34°C).

Sans urée, et $c_{urée} = 2\text{ M}, 3,5\text{ M}, 4\text{ M}; x = 0,5$.

En urée 4 M : $c_{urée} \quad x \approx 0,1$.

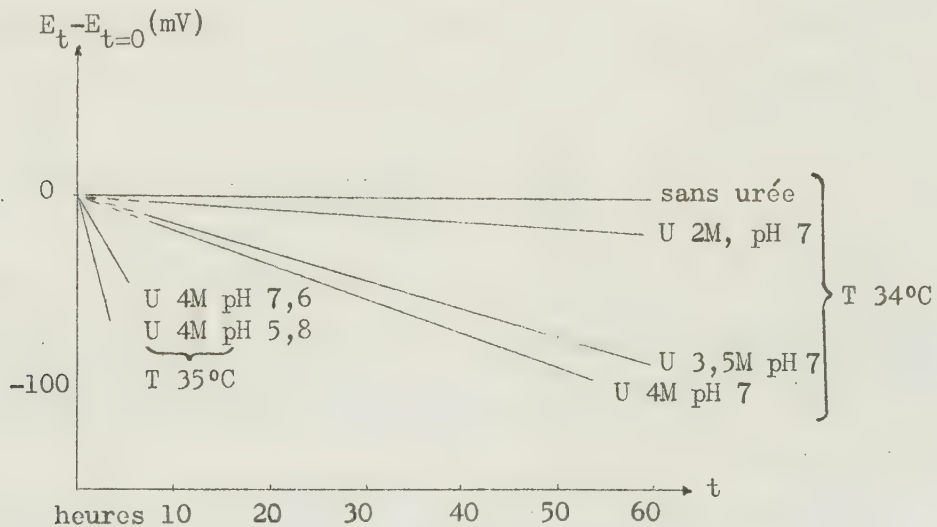


Figure 27.

Récapitulation des résultats représentés dans les figures 24, 25 et 26.

En ordonnées : $E_t - E_{t=0}$.

En abscisses : t (temps).

des vitesses d'évolution du potentiel : on a porté en abscisses les variations de potentiel ΔE correspondant à un temps déterminé d'évolution, en ordonnées, les variations du log de la concentration en forme spectrale A, soit $\Delta \log A$, pendant le même temps ; les points noirs se rapportent à 50 heures d'évolution, les points clairs, relatifs à des évolutions beaucoup plus rapides, à 5 heures d'évolution. Les points expérimentaux s'alignent sur une droite passant par l'origine des axes.

Ces résultats montrent que la vitesse d'évolution du potentiel est proportionnelle à la vitesse d'évolution spectrale de la méthémoglobine, dans les mêmes conditions de concentration en urée, de pH et de température.*

(c) Interprétation des résultats.

Si l'on admet que le potentiel E à chaque instant est déterminé par les proportions présentes d'hémoglobine et de méthémoglobine restées identiques à elles-mêmes depuis le commencement de l'expérience, on peut écrire :

$$(1') \quad E = E'_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(\text{méthémoglobine})}{(\text{hémoglobine})}, \quad n \approx 1,6.$$

En présence d'urée, les molécules d'hémoglobine et de méthémoglobine contiennent deux hèmes ; pour certaines les deux hèmes sont à l'état réduit ; pour d'autres ils sont à l'état oxydé tandis qu'il

* La méthémoglobine de cheval ne présente pas d'évolution spectrale sensible, en urée 4 M, à une température de 30°C : on comprend donc que Taylor ait pu utiliser la technique de titrage.

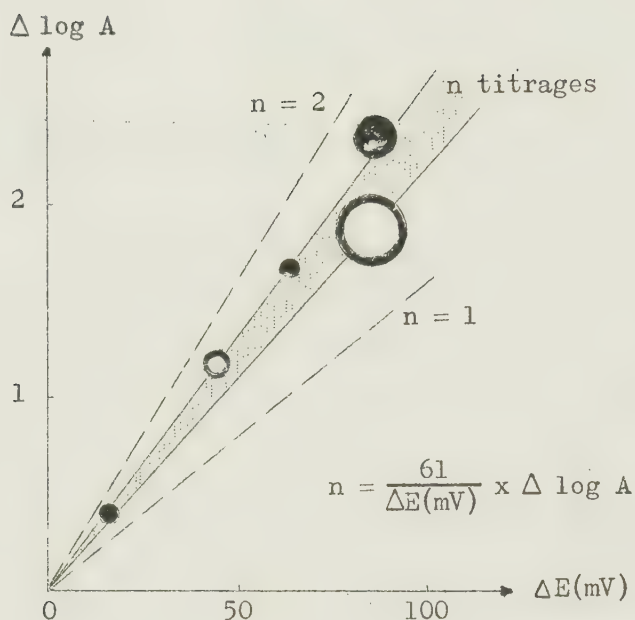


Figure 28.

Comparaison des vitesses d'évolution spectrale de la méthémoglobine et des vitesses d'évolution du potentiel d'un mélange hémoglobine - méthémoglobine à un taux d'oxydation globale donné.

Points: en ordonnées, $\Delta \log A$ (A, concentration en forme spectrale initiale),
en abscisses, ΔE (mV).

(Points noirs: 50 heures d'évolution;
points blancs: 5 heures d'évolution).

Le faisceau hachuré correspond à l'ensemble des résultats obtenus par titrage (en ordonnées, $\Delta \log$ (méthémoglobine/hémoglobine), en abscisses, $\Delta E(\text{mV})$).

existe dans la solution des molécules contenant 1 hème à l'état réduit, 1 hème à l'état oxydé - ce que traduit la valeur fractionnaire de n . On désignera par a , c , b , les concentrations de ces trois sortes de molécules.

$$\text{A l'instant zéro : } E_{t=0} = E'_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{2 c_0 + b_0}{2 a_0 + b_0} ,$$

$$\text{à l'instant } t : E_t = E'_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{2 c + b}{2 a + b} .$$

A côté des molécules restées intactes, la solution contient des molécules qui ont subi des modifications. L'étude spectrale a montré que seule la méthémoglobine subissait une modification spectrale ; cette étude avait laissé le choix entre deux hypothèses : transformations successives ou simultanées des deux moitiés de la molécule. Si l'on adopte l'hypothèse que la transformation spectrale se rapportant à chacun des hèmes oxydés se fait de façon parfaitement indépendante, on doit admettre que la solution contient, outre les molécules intactes, des molécules "hémoglobine-méthémoglobine transformée", soit b' leur concentration ; des molécules "méthémoglobine intacte - méthémoglobine transformée", soit c' leur concentration ; des molécules "méthémoglobine transformée - méthémoglobine transformée", soit c'' leur concentration. Les concentrations initiales en hémoglobine et méthémoglobine, exprimées en atomes de fer, sont donc respectivement :

$$2 a_0 + b_0 = 2 a + b + b'$$

$$2 c_0 + b_0 = 2 c + b + b' + 2 c' + 2 c'' ,$$

cette dernière est la concentration spectrale A_0 en méthémoglobine intacte à l'instant initial ; à l'instant t , elle est devenue A :

$$A = 2 c + b + c'$$

L'étude de la disparition de la forme A a montré que :

$$\ln \frac{A_0}{A} = jt, \quad \text{soit} \quad jt = \ln \frac{2 c + b + b' + 2 c' + 2 c''}{2 c + b + c'}$$

Or la figure 28 indique que :

$$(2) \quad \Delta E = \frac{61}{n} \Delta \log A, \quad n \approx 1,6,$$

c'est-à-dire, à la température des expériences (35°C),

$$(2') \quad \Delta E = \frac{RT}{n\mathcal{F}} \ln \frac{A_0}{A},$$

$$\text{or} \quad \Delta E = E_{t=0} - E_t = \frac{RT}{n\mathcal{F}} \ln \frac{(2 c_0 + b_0)}{(2 a_0 + b_0)} \times \frac{(2 a + b)}{(2 c + b)}.$$

On en déduit, en remplaçant A_0 , A et ΔE par leurs expressions dans la relation expérimentale (2') :

$$(3) \quad \frac{2 a + b}{2 c + b} = \frac{2 a + b + b'}{2 c + b + c'} = \frac{b'}{c'}.$$

Mais b' et c' sont les concentrations respectives en molécules

"hémoglobine-méthémoglobine transformée", "méthémoglobine-méthémoglobine transformée", substances qui sont évidemment susceptibles d'être

en équilibre d'oxydo-réduction; cet équilibre s'exprimerait par la relation :

$$(4) \quad E = E_3 + \frac{RT}{\mathcal{F}} \ln \frac{c'}{b'}$$

Comparons (1') et (4), en tenant compte de la relation (3) :

$$E'_0 - E_3 = \frac{RT}{\mathcal{F}} \left(1 - \frac{1}{n}\right) \ln \frac{(\text{méthémoglobine})}{(\text{hémoglobine})}.$$

Cette équation ne peut être vérifiée car le rapport $\frac{(\text{méthémoglobine})}{(\text{hémoglobine})}$ varie au cours de l'évolution. On a donc nécessairement $b' = 0$, $c' = 0$, ce qui signifie qu'il n'y a pas de formes intermédiaires.

Il faut donc admettre que la transformation spectrale de la méthémoglobine se fait sans stade intermédiaire, il n'y aurait alors dans la solution, outre les molécules intactes, que des molécules "méthémoglobine transformée - méthémoglobine transformée". Un problème se pose : celui de la transformation des molécules "hémoglobine - méthémoglobine" : on peut admettre que la transformation qui touche la partie oxydée d'une telle molécule entraîne la transformation de toute la molécule, et que l'hémochromogène alors formé s'oxyde aussitôt (aux dépens, par exemple, d'une molécule "hémoglobine-méthémoglobine") car le potentiel du milieu est nettement supérieur au potentiel d'oxydo-réduction de la méthémoglobine évoluée et de son hémochromogène (cf. p.110).

Si l'on exprime $E_{t=0} - E_t = \Delta E$, et $\ln \frac{A_0}{A} = \Delta \ln A$, on obtient.

les deux relations :

$$\Delta E = \frac{RT}{nF} \ln \frac{(2a + b)}{(2c + b)} \times \frac{(2c + b + 2c'')}{(2a + b)} = \frac{RT}{nF} \ln \frac{2c + b + 2c''}{2c + b},$$

$$\Delta \ln A = \ln \frac{(2c + b + 2c'')}{(2c + b)}.$$

La relation expérimentale (2') $\Delta E = \frac{RT}{nF} \ln \frac{A_0}{A}$ (figure 28) conduit à une identité, ce qui semble une justification de l'hypothèse proposée.

L'étude de l'évolution du potentiel d'un mélange hémoglobine-méthémoglobine montre donc que la transformation manifestée par la

modification spectrale de la méthémoglobine se fait d'un seul coup sur l'ensemble de la molécule^X.

Remarques : 1) La technique d'étude cinétique du potentiel, qui suit logarithmiquement l'évolution de la méthémoglobine, est peu sensible dans la période que l'évolution spectrale permet de suivre : le potentiel E ne varie que de 10 mV environ quand la concentration en méthémoglobine est réduite de moitié. En revanche elle permet de suivre la disparition de la méthémoglobine beaucoup plus loin que la technique spectrale : entre le début de l'évolution linéaire du potentiel et la fin de l'observation, le potentiel décroît de 100 mV environ (fig. 25, 26), la teneur en méthémoglobine a varié pendant cette évolution dans le rapport de 1 à 1/400 environ, teneur trop faible pour que la technique spectrale puisse permettre de l'apprécier. Ceci permet de reculer les limites des conclusions auxquelles avait conduit l'étude cinétique des modifications spectrales : rien dans nos expériences ne permet de mettre en évidence un équilibre entre les formes initiale et finale de méthémoglobine : si un tel équilibre existait, il correspondrait à une proportion de la forme initiale inférieure à 1/2000.^{XX}

2) On pouvait penser que l'abaissement progressif du potentiel en présence d'urée était lié au moins pour une partie à l'apparition de groupes SH, lors de la transformation de la méthémoglobine.

^X Résultat à rapprocher de celui de Zaiser et Steinhardt (50) sur la dénaturation de la carboxyhémoglobine de cheval, en milieu acide.

^{XX} Steinhardt et Zaiser (39) ont au contraire montré que la dénaturation acide de la méthémoglobine de cheval était réversible.

Une telle interprétation ne pourrait rendre compte du rapport entre les vitesses d'évolution spectrale de la méthémoglobine seule et les vitesses d'évolution du potentiel pour un taux quelconque d'oxydation, $\frac{\Delta \log A}{\Delta E} = \frac{nF}{2,3 RT}$. elle ne pourrait pas non plus rendre compte du fait que les vitesses sont indépendantes du taux d'oxydation.

B - Comparaison des potentiels, pour un taux donné d'oxydation, du système hémoglobine-méthémoglobine humaines non évoluées, en l'absence ou en présence d'urée.

1° Extrapolation au temps zéro de la droite E, fonction du temps.

Cette extrapolation doit donner la valeur E' du potentiel, pour le rapport initial des concentrations en méthémoglobine et en hémoglobine ; le temps zéro est l'instant où l'on mélange le contenu des deux compartiments. A partir de la valeur E' on peut déterminer la valeur du potentiel de demi-oxydation dans les différentes conditions étudiées, nous le désignerons par E'_0 lorsqu'il n'y a pas d'urée, par $E'_{U,0}$, en présence d'urée. Ces résultats permettent aussi de déterminer n et nous avons retrouvé dans tous les cas (en l'absence comme en présence d'urée) une valeur voisine de 1,6.

La principale erreur que l'on puisse commettre dans cette détermination est due à l'erreur sur le taux d'oxydation initiale, qui est donné par les quantités d'oxyhémoglobine et de ferricyanure introduits dans le tube ; cette erreur est due en partie à l'erreur sur le titre de la solution d'oxyhémoglobine, mais surtout aux erreurs

sur les pipetages ; elle peut atteindre 15 % pour le rapport $\frac{\text{(méthémoglobine)}}{\text{(hémoglobine)}}$, même à la demi-oxydation, où elle est minimum ; l'erreur correspondante sur le potentiel est de 3 mV environ. Même si une fraction de la méthémoglobine avait eu, au début de la réaction, une évolution rapide, cette fraction n'excéderait pas 10 % dans les conditions de ces expériences, et l'abaissement correspondant du potentiel, dont il faudrait corriger E' , serait inférieur à 2 mV.

A cette erreur, s'ajoutent l'erreur liée à l'incertitude sur la valeur du pH de la solution (0,03 unité de pH environ), et les erreurs dues à la mesure du potentiel elle-même (2 à 3 mV). On se rend compte ainsi que l'incertitude totale sur la détermination du potentiel de demi-réduction E'_0 par cette méthode, peut atteindre 6 à 7 mV.

Les valeurs obtenues au cours de ces mesures, effectuées sur de l'hémoglobine humaine, n'accusent pas de différence avec celles obtenues par Taylor (40), sur les hémoglobines de cheval ou de chien, dans les mêmes conditions de pH et de concentration en urée (fig.22). Lorsque la température est voisine de 30°C, en l'absence d'urée, à pH 7, la valeur de E'_0 est de 145 à 150 mV ; en présence d'urée 4 M, à pH 7, elle est $E'_0 \approx 90$ à 100 mV.

Le potentiel de demi-oxydation du système hémoglobine-méthémoglobine est donc, indépendamment de l'origine de cette hémoglobine, abaissé de 50 à 60 mV par la présence d'urée 4 M sans que l'hémoglobine ni la méthémoglobine ne présentent alors de modification spectrale.

2° Variations de $E'_{U,O}$ avec la concentration en urée.

L'étude des cinétiques d'évolution du potentiel pour des concentrations différentes en urée mais à un même pH et à un même taux global d'oxydation, nous a permis de comparer, par extrapolation au temps zéro des droites $E(t)$, les potentiels de demi-oxydation E'_O en urée 4 M et en urée 2 M. Le potentiel en urée 2 M est de 10 mV environ plus élevé que le potentiel en urée 4 M. D'autre part, si l'on fait passer la concentration en urée de la valeur 4 M à la valeur 2 M, le potentiel s'élève aussitôt de 10 mV environ ; cette expérience est facilement réalisable en utilisant un tube de Thunberg à trois branches.

L'effet de la concentration en urée sur le potentiel d'oxydo-réduction du système hémoglobine-méthémoglobine est un phénomène réversible et immédiat : l'influence de l'urée sur le potentiel de demi-oxydation du système hémoglobine-méthémoglobine semble donc lié à une action immédiate et réversible. Or l'effet des variations du taux d'urée sur la cinétique d'évolution spectrale de la méthémoglobine (p.54) présentait les mêmes caractères. Nous pensons que l'ensemble de ces résultats permet d'envisager une action primaire de l'urée sur chacune de ces substances ; cette action serait réversible et pratiquement immédiate. Nous la considérerons dans ce qui suit comme une réaction d'équilibre dont on peut définir dans les différents cas la variation d'énergie libre ΔF , la variation d'enthalpie ΔH , la variation d'entropie ΔS . Nous désignerons par ΔF_1 , ΔH_1 , ΔS_1 , les valeurs de ces grandeurs pour

l'hémoglobine, tandis que les notations ΔF_2 , ΔH_2 , ΔS_2 se rapporteront à la méthémoglobine ; dans l'un et l'autre cas, elles correspondront à la transformation d'une quantité d'hémoprotéine qui renferme 1 atome-gramme de fer.

L'effet de l'urée sur le potentiel d'oxydo-réduction du système hémoglobine-méthémoglobine doit permettre de comparer les actions primaires de l'urée sur l'hémoglobine et sur la méthémoglobine. Soient deux solutions contenant un mélange d'hémoglobine et de méthémoglobine à demi-oxydation, l'une sans urée, l'autre avec urée, tamponnées identiquement au même pH. Si l'on plonge une électrode de platine dans chacune de ces solutions, réunies par une jonction liquide, on constitue une pile dont la f.e.m. est $(E'_O - E'_{U,O})$: le pôle négatif se trouve du côté de l'urée. Si l'on réalise réversiblement le transfert d'un électron-gramme ($\mathcal{F}$) du pôle - au pôle + de la pile, le travail électrique recueilli est $\mathcal{Q} = \mathcal{F}(E'_O - E'_{U,O})$; il est égal et de signe contraire à la variation d'énergie libre qui accompagne l'ensemble des modifications chimiques liées à ce transfert dans la pile : dans le compartiment avec urée, une certaine quantité d'hémoglobine se transforme en méthémoglobine (celle qui contient 1 atome-gramme de fer, 1 atome-gramme $Fe^{++} \rightarrow$ 1 atome-gramme $Fe^{+++} + \mathcal{F}^-$) tandis que dans le compartiment sans urée, une quantité équivalente de méthémoglobine se transforme en hémoglobine (1 atome-gramme $Fe^{+++} + \mathcal{F}^- \rightarrow$ 1 atome-gramme Fe^{++}). Le bilan de ce transfert d'électrons, pour des masses d'hémoprotéines renfermant 1 atome-gramme de fer, est donc équivalent au passage de la méthémoglobine d'une solution sans urée à une solution avec urée (variation d'éner-

gie libre ΔF_2), et au passage d'hémoglobine d'une solution avec urée à une solution sans urée (variation d'énergie libre - ΔF_1). La variation d'énergie libre chimique, exactement compensée par la variation d'énergie libre électrique - $\mathcal{E}$, est ($\Delta F_2 - \Delta F_1$), ce qui donne :

$$\Delta F = \Delta F_1 - \Delta F_2 = \mathcal{F} (E'_O - E'_{U,O}).$$

On obtient ainsi, à 35°C, en urée 4 M, $\Delta F \approx 1200 \pm 100$ cal/mol, en urée 2 M, $\Delta F \approx 1000$ cal/mol.

3° Variations de $(E'_O - E'_{U,O})$ avec la température.

La connaissance des variations de ΔF avec la température, soit $\partial \Delta F / \partial T$, doit permettre d'atteindre la différence des variations d'entropie :

$$\begin{aligned} \Delta S &= \Delta S_1 - \Delta S_2, \\ \Delta S &= - \partial \Delta F / \partial T \end{aligned}$$

et la différence des variations d'enthalpie,

$$\begin{aligned} \Delta H &= \Delta H_1 - \Delta H_2 \\ \Delta H &= \Delta F - T \partial \Delta F / \partial T, \end{aligned}$$

qui correspondent à l'action primaire de l'urée sur l'hémoglobine et la méthémoglobine respectivement.

Nous avons donc cherché à déterminer les variations avec la température de $(E'_O - E'_{U,O}) = \Delta F / \mathcal{F}$. Nous avons mesuré directement la différence de potentiel $(E'_O - E'_U) = \Delta E'$ qui correspond à deux mélanges donnés, au même pH, l'un ne contenant pas d'urée, soit E'_O , l'autre contenant de l'urée 4 M, soit E'_U .

Dans cette étude, on prépare les mélanges dans des tubes de

Thunberg comme dans les expériences précédentes : les deux tubes (sans urée et avec urée) sont plongés dans le même bain de chlorure de potassium et leur ensemble constitue une pile. On la place d'abord à une température T ; on attend que l'équilibre des électrodes soit atteint dans chacun des tubes. On note alors, à l'instant θ , la f.e.m. de cette pile, soit $\Delta E'_T$. On porte aussitôt la pile à une température T' : on constate que les électrodes se mettent très vite en équilibre (moins de 10 minutes) ; on mesure la f.e.m. $\Delta E'_{T'}$ de la pile. La différence $\Delta E'_T - \Delta E'_{T'}$ représente sensiblement * la variation $\delta(E' - E'_U)$ de $(E' - E'_U)$ qui correspond à la variation de température $\delta T = (T - T')$. Pour une élévation de température de 15° , on observe une diminution de $(E' - E'_U)$ de 10 mV environ.

On pourrait objecter que la présence d'urée dans un des compartiments de la pile introduit un potentiel de jonction ΔV dont les variations avec la température apporteraient une contribution non négligeable $\delta \Delta V$ à l'effet observé. Les résultats des mesures de pH des solutions tamponnées de méthémoglobine (tampons phosphates), sans urée ou avec urée, à plusieurs températures, permettent d'éliminer cette éventuelle contribution $\delta \Delta V$: en effet, on ne mesure pas de variation sensible du pH de ces solutions avec la température (entre 20°C et 35°C), et ce, qu'elles ne contiennent pas d'urée ou

*. L'abaissement du potentiel E'_U , dû à l'évolution de la solution pendant le temps très court de mise en équilibre des électrodes, à la température T' , n'excède pas 1 mV ; il est donc nettement inférieur à l'effet étudié ici.

qu'elles en contiennent. Or l'effet ΔV^* s'introduirait seulement dans les mesures en présence d'urée ; on sait que le pH des tampons phosphates reste pratiquement constant dans ce domaine de températures ; il semble donc assez raisonnable d'admettre que le pH de toutes ces solutions est resté effectivement constant, et que l'effet $\delta \Delta V$ est négligeable. S'il n'en est pas ainsi, c'est que l'effet de variation du potentiel de jonction et l'effet de variation de pH se compensent exactement dans la mesure du pH. Une telle compensation exacte se retrouverait dans l'étude des potentiels d'oxydo-réduction, puisque la loi de variation du potentiel d'oxydo-réduction du système méthémoglobine-hémoglobine avec le pH, entre pH 6,5 et pH 9, en l'absence ou en présence d'urée, est sensiblement le même que celle de l'électrode de verre. On peut donc affirmer que la variation $\delta (E'_O - E'_{U,O}) / \delta T$ correspond à la variation de la différence des potentiels d'oxydo-réduction des deux systèmes, sans urée ou avec urée.

Il est possible de calculer à partir de la variation mesurée la variation $\delta (E'_O - E'_{U,O})$ qui correspond aux potentiels E'_O et $E'_{U,O}$ de demi-oxydation, sans urée ou en présence d'urée 4 M, même si le rapport ρ des concentrations en méthémoglobine et en hémoglobine n'est pas le même dans les deux tubes (en admettant qu'il fût le même au temps zéro, il pourrait être notablement différent à l'instant θ de la comparaison, du fait de la disparition de la méthémoglobine en pré-

*

Le même que dans les mesures de potentiel d'oxydo-réduction.

sence d'urée, non négligeable au cours de la première mise en équilibre des électrodes).

$$\text{En effet, } E' = E'_O + \frac{RT}{n\mathcal{F}} \ln \frac{(\text{méthémoglobine})}{(\text{hémoglobine})}$$

$$E'_U = E'_{U,O} + \frac{RT}{n\mathcal{F}} \ln \frac{(\text{méthémoglobine } U)}{(\text{hémoglobine } U)}$$

$$(E'_O - E'_{U,O}) = (E' - E'_U) - \frac{RT}{n\mathcal{F}} \ln \rho / \rho_U$$

soit $(E'_O - E'_{U,O}) = (E' - E'_U) - a$, si nous posons

$$a = \frac{RT}{n\mathcal{F}} \ln \rho / \rho_U.$$

La variation $\delta(E'_O - E'_{U,O})$ qui correspond à une variation δT de T est donc $\delta(E'_O - E'_{U,O}) = \delta(E' - E'_U) - \delta a$,

or, $\delta a = a \delta T/T$.

La comparaison entre la valeur $(E' - E'_U)$ mesurée et la valeur de l'abaissement du potentiel produit par la présence d'urée (50 à 60 mV) donne a avec un degré d'approximation suffisant pour évaluer δa : a n'a pas dépassé + 20 à + 30 mV, ce qui donne une valeur de δa de 1,5 mV environ, pour une différence de température δT de + 15° ; nous avons tenu compte de cette correction, qui est d'ailleurs faible par rapport à l'effet observé.

L'ensemble des résultats obtenus a montré que l'effet d'une variation de température sur l'abaissement du potentiel de demi-oxydation du système hémoglobine-méthémoglobine produit par la présence d'urée 4 M est un phénomène réversible. C'est là une nouvelle manifestation du caractère réversible de l'action primaire de l'urée sur l'hé-

moglobine et la méthémoglobine.

La valeur de $\delta (E'_O - E'_{U,O}) / \delta T$ est de $- (0,6 \text{ mV} \pm 0,15 \text{ mV})$ par degré ; elle permet de calculer la variation avec la température de la différence des variations d'énergie libre ΔF_1 et ΔF_2 relatives à l'action primaire de l'urée sur l'hémoglobine et la méthémoglobine :

$$\delta (E'_O - E'_{U,O}) / \delta T = \delta (\Delta F_1 - \Delta F_2) / \delta T,$$

soit $- (14 \pm 3) \text{ cal/deg}^\circ$. Nous en déduisons la valeur de la différence des variations d'entropie,

$$\Delta S = \Delta S_1 - \Delta S_2 = - \delta (\Delta F_1 - \Delta F_2) / \delta T,$$

$$\Delta S = 14 \pm 3 \text{ cal/deg}^\circ,$$

et la valeur de la différence des variations d'enthalpie,

$$\Delta H = \Delta H_1 - \Delta H_2 = (\Delta F_1 - \Delta F_2) + T(\Delta S_1 - \Delta S_2),$$

$$\Delta H = \Delta H_1 - \Delta H_2 = 5500 \pm 1500 \text{ cal/mol}.$$

Le rapport $\Delta H / \Delta S$ est le même que celui qui correspond à la rupture d'une liaison hydrogène ; les valeurs de ΔH et de ΔS indiquent que lors de l'action primaire de l'urée, la différence entre le nombre de liaisons hydrogène rompues dans l'hémoglobine et la méthémoglobine, ne dépasserait pas 3. Mais il nous semble qu'il faille se garder d'une interprétation trop simpliste : l'effet observé, comme la traduction énergétique que nous en donnons, représente une différence globale des effets primaires de l'urée sur l'hémoglobine et la méthémoglobine et rien ne permet de la localiser^x.

x

Cf. Wyman et Allen (48).

Wyman (47) souligne le fait que les modifications apportées par l'urée aux énergies libres d'oxydation et d'oxygénation de l'hémoglobine sont très sensiblement égales * comme le montrent les travaux de Taylor (40), et Taylor et Hastings (42). Il serait intéressant à cet égard d'étudier les variations avec la température des modifications apportées par l'urée à l'énergie libre d'oxygénation.

* L'énergie libre d'oxydation est donnée par le potentiel d'oxydo-réduction du système hémoglobine-méthémoglobine, l'énergie libre d'oxygénation est donnée par la pression d'oxygène en équilibre avec l'hémoglobine et l'oxyhémoglobine.

V . Potentiel d'oxydo-réduction, en présence d'urée, de la méthémoglobine déjà évoluée dans l'urée et de sa forme réduite.

Cette étude ne peut évidemment se faire qu'en présence d'urée, car les produits d'évolution de la méthémoglobine sous l'action de l'urée sont insolubles en l'absence d'urée.

Si l'urée a agi suffisamment longtemps sur la méthémoglobine pour que la bande d'absorption dans le rouge ait complètement disparu, la réduction de la solution par addition d'hydrosulfite de sodium par exemple, fait apparaître les bandes d'absorption caractéristiques d'un hémochromogène (p.65). Le titrage potentiométrique d'oxydo-réduction, par réduction (hydrosulfite de sodium), puis par réoxydation (ferricyanure de potassium), montre la présence dans la solution d'un système oxydo-réducteur très électroactif à bas potentiel. Au cours du titrage par oxydation, dès que le corps à bas potentiel est oxydé, il devient très difficile de poursuivre le titrage : lorsque l'on ajoute du ferricyanure de potassium, le potentiel, après avoir augmenté, décroît continuellement, sans atteindre un équilibre. La figure 29 représente les variations du potentiel E en fonction de $\log \frac{x}{1-x}$ (x, taux d'oxydation) : que l'on opère par réduction ou par oxydation, les points s'alignent sensiblement sur une même droite, dont la pente est 60 mV environ ; on a donc affaire à un système oxydo-réducteur bien défini (réversibilité vérifiée), pour lequel n, nombre apparent

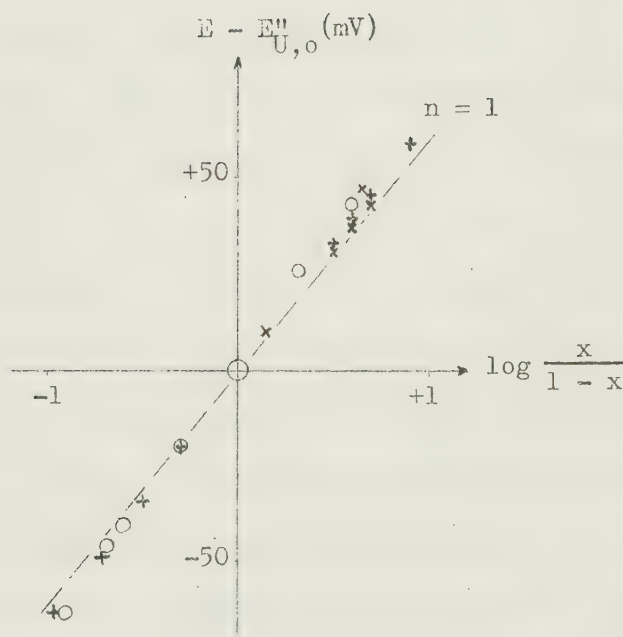


Figure 29.

Variations avec le taux d'oxydation x du potentiel d'oxydo-réduction du système méthémoglobine déjà évoluée en présence d'urée et de sa forme réduite (urée 4 M à 8 M, pH voisin de 7).

En ordonnées: $E - E''_{U,o}$ ($E''_{U,o}$, potentiel de demi-oxydation, voisin de -170 mV).

En abscisses: $\log \frac{x}{1-x}$.

d'électrons en jeu, a la valeur 1. Le potentiel de demi-oxydation donné par le point de rencontre de la droite et de l'axe des ordonnées, est $E''_{U,O} = -170 \text{ mV}$.

Seul le titrage par oxydation permet un dosage de la quantité de ce système présente dans le vase à titrage ; or, si l'on compare la quantité de ferricyanure de potassium nécessaire au titrage et la quantité de fer totale contenue dans l'hémoprotéine présente, on constate que la première est plus faible, d'autant plus faible que le taux d'urée est moins fort et que le temps de repos à l'état réduit a été plus long. L'étude spectrale de l'évolution en présence d'urée de l'hémochromogène obtenu par réduction de méthémoglobine évoluée permet d'expliquer ces faits, et d'identifier le système à bas potentiel : le titrage par oxydation est suffisamment rapide (système très électroactif) pour que l'hémochromogène présent au début du titrage n'évolue pas sensiblement pendant le titrage ^x, et les formes réduite et oxydée sont tout le long du titrage par réduction, l'hémochromogène et la forme évoluée de méthémoglobine. C'est le système à bas potentiel $E''_{U,O} = -170 \text{ mV}$, pour lequel $n = 1$.

Nous pouvons remarquer que ce potentiel est nettement plus négatif que celui de l'hémochromogène de globine préparé et étudié en

^x Bien que les écarts à la droite de pente 60 mV ne soient guère supérieurs aux erreurs possibles, ils semblent être systématiquement par excès (une dizaine de mV), et plus particulièrement lors des titrages par oxydation, ce qui correspond à une raideur trop grande de la courbe de titrage ; on peut en rendre compte par une légère évolution de l'hémochromogène en cours de titrage.

l'absence d'urée par Barron (4) : environ -100 mV au même pH.

Lorsque l'hémochromogène présent est complètement oxydé, ce que l'on titre c'est de l'hémoglobine "réversée" provenant d'une évolution de l'hémochromogène, et la méthémoglobine, sitôt formée lors de l'addition de ferricyanure, évolue en présence d'urée, donc disparaît de l'équilibre ; on comprend alors pourquoi le potentiel baisse sans se stabiliser.

On peut tenter d'interpréter ces résultats :

1° Valeur de n ($n=1$)

Les mesures de constante de sédimentation de la méthémoglobine évoluée en urée 4 M amènent à supposer que la molécule contient 2 hèmes (p.60) ; la valeur $n = 1$ montre que les interactions entre ces deux hèmes sont nulles, lors de la réduction de la forme évoluée de la méthémoglobine en hémochromogène.

2° Valeur du potentiel de demi-oxydation, $E''_{U,O} \approx -170$ mV.

Bien que nous n'ayons pas mis d'équilibre en évidence entre la méthémoglobine non évoluée et la méthémoglobine évoluée en présence d'urée, non plus qu'entre l'hémoglobine et l'hémochromogène obtenu par réduction de la méthémoglobine évoluée, cela ne signifie pas que de tels équilibres n'existent pas, mais seulement que les constantes d'équilibre correspondantes sont très différentes de l'unité : la première serait supérieure à 2.10^3 , comme nous l'avons indiqué p.97.

Faisons donc l'hypothèse que ces équilibres existent, et adoptons le même mode de raisonnement que celui développé au sujet des actions primaires de l'urée sur la méthémoglobine et l'hémoglobine. La comparaison des potentiels de demi-oxydation de l'hémoglobine

($E'_{U,o} = +100$ mV), et de l'hémochromogène ($E''_{U,o} = -170$ mV), dans les mêmes conditions (pH 7, urée 4 M), permettrait de comparer les variations d'énergie libre ΔF_I et ΔF_{II} des transformations de l'hémoglobine en hémochromogène et de la méthémoglobine en méthémoglobine évoluée. La différence $\Delta F_I - \Delta F_{II}$ est égale au travail électrique $\mathcal{F}(E'_{U,o} - E''_{U,o})$:

$$\mathcal{F}(E'_{U,o} - E''_{U,o}) = \Delta F_I - \Delta F_{II} ;$$

or ($E'_{U,o} - E''_{U,o}$) = 270 mV, on en déduit: $\Delta F_I - \Delta F_{II} = 6500$ calories. Une telle différence dans les variations d'énergie libre de ces transformations correspondrait à un rapport des constantes d'équilibre éventuel K_I et K_{II} de ces deux réactions, K_I/K_{II} de l'ordre de 10^{-5} , ce qui n'est pas en contradiction avec les résultats des études cinétiques.

VI . Influence de l'urée sur les potentiels d'oxydo-réduction
du système ferro-ferrihémine et du système ferro-ferrihémine complexe
xée à l'histidine.

Le chlorhydrate d'hémine a été préparé ²¹ par action de l'acide acétique saturé de chlorure de sodium, à chaud, sur les hématies lavées ; le chlorhydrate d'hémine cristallise de la solution filtrée ; on le purifie par plusieurs cristallisations dans l'alcool (technique de Drabkin et Austin (20)). Le dosage spectral, en solution nettement alcaline, nous a montré que le produit présentait le même degré de pureté que celui des auteurs précédemment cités.

Nous avons étudié les potentiels d'oxydo-réduction de l'hémine et du complexe hème-histidine dans des conditions aussi voisines que possible des conditions d'étude de l'hémoglobine. Nous avons opéré par titrage, en solution tamponnée par les phosphates de potassium (M/10), entre pH 7 et pH 7,6, en l'absence d'urée ou en présence d'urée 4 M.

L'hémine est difficilement soluble à ce pH, aussi commençons-nous toujours par la dissoudre dans une solution de potasse (M/10), sans urée ou avec urée, et dans l'un et l'autre cas, sans histidine

*

Cette préparation a été effectuée, au laboratoire de Monsieur le Professeur Fromageot, par Mademoiselle Claude Gutton, que nous remercions bien vivement.

ou avec histidine ^x ; à cette solution, nous ajoutions progressivement la quantité nécessaire d'une solution concentrée de phosphate monopotassique afin d'obtenir le pH désiré.

La concentration en hémine correspondait à 0,15 milliatome de fer par litre. La concentration en histidine était 0,05 M et 0,13 M. Nous réduisions l'hémine par l'hydrosulfite de sodium et nous ajoutions progressivement une solution de ferriocyanure de potassium de titre connu.

Dans les différents cas, nous avons obtenu une courbe de titrage correspondant à une valeur de n , nombre d'électrons en jeu dans l'oxydo-réduction étudiée, égale à 1 (fig. 30). Les valeurs obtenues pour le potentiel de demi-oxydation sont données en fonction du pH sur la figure 31. Elles comportent quelque incertitude, en particulier celles qui se rapportent à l'hémine en l'absence d'urée, à pH voisin de 7, ce qui s'explique par l'hémine se dissout alors très mal, et l'existence de gros agglomérats dans la solution n'est pas exclue.

Néanmoins, ces quelques expériences que nous considérons comme préliminaires, semblent indiquer que l'urée n'a pas d'effet appréciable sur le potentiel ferro-ferrihémine, tandis qu'il abaisse sensiblement le potentiel du système ferro-ferrihémine complexée à l'histidine. Si l'on reprend les conceptions de Clark (8) développées par Barron (5), sur l'énergie de liaison des ferro ou ferrièmes avec une base azotée, on peut interpréter ces faits en admet-

^x

L(-)histidine Hoffmann-La Roche.

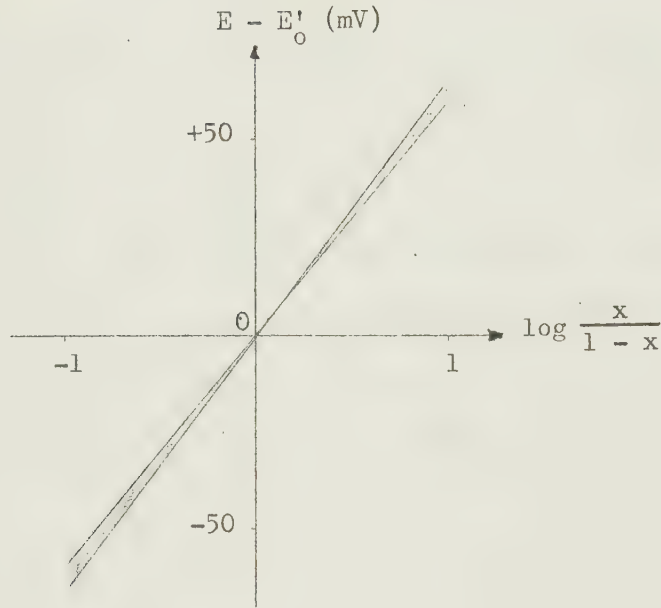


Figure 30.

Systèmes ferro-ferri hémine et ferro-ferri hémine complexée à l'histidine, en l'absence ou en présence d'urée; détermination de n ($n = 1$).

En ordonnées : $E - E'_0$; en abscisses : $\log \frac{x}{1-x}$.

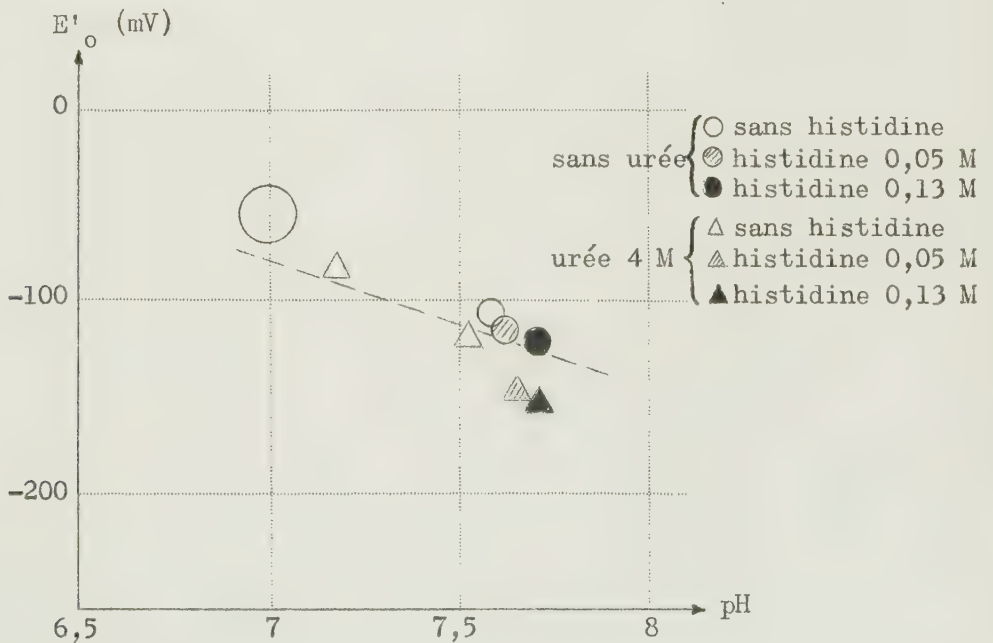


Figure 31.

Potentiels de demi-oxydation E'_0 des mêmes systèmes que ci-dessus (fig. 30), à différents pH.

En ordonnées : E'_0 ; en abscisses, pH.

tant que l'urée augmente plus fortement l'énergie de liaison ferrihème-histidine que l'énergie de liaison ferrohème-histidine. Cependant, l'effet de l'urée sur le potentiel du système ferro-ferrihème complexée à l'histidine, semble plus faible que celui observé sur le système hémoglobine-méthémoglobine. On peut donc penser que la différence entre les actions de l'urée sur l'hémoglobine et la méthémoglobine n'est pas strictement localisée à la liaison hème-globine.

CONCLUSION

Les données apportées par le présent travail montrent qu'il est souvent possible - lors de la transformation d'une protéine et malgré la complexité apparente de cette transformation - d'isoler un petit nombre de réactions simples, mettant en jeu un nombre restreint de groupes. Ces réactions se présentent comme des "réactions clefs", pour une transformation d'ensemble de la molécule.

L'étude cinétique des modifications spectrales de la méthémoglobine en solution tamponnée en présence d'urée, a permis en effet de mettre en évidence, dans des conditions expérimentales soigneusement limitées, une transformation simple ; elle a montré que cette transformation est commandée par une réaction du premier ordre, pratiquement non limitée, dont on a pu déterminer les caractéristiques thermodynamiques (énergie libre, enthalpie, entropie d'activation). Cette réaction se produit vraisemblablement au voisinage d'un hème. Elle est suivie de la transformation d'ensemble de toute la molécule, sans qu'apparaisse aucun produit intermédiaire à durée de vie appréciable (comme a permis de le préciser l'étude de l'évolution du potentiel d'oxydo-réduction d'un mélange hémoglobine-méthémoglobine).

Au cours de ce travail, on a pu dégager quelques caractéristiques de l'effet de l'urée sur la méthémoglobine, et comparer son action sur l'hémoglobine et la méthémoglobine : cet effet paraît lié à une action immédiate, dépendant de façon réversible de la concentration en urée.

Le présent travail a été effectué au laboratoire de Biologie physicochimique de la Faculté des Sciences, sous la direction de Monsieur le Professeur René Wurmser, à qui j'exprime ma profonde gratitude.

BIBLIOGRAPHIE

1. Anson, M.L., Adv. in Protein Chemistry II (1945) 361.
2. Anson, M.L., Mirsky, A.E., J. Gen. Physiol. 17 (1934) 399.
3. Austin, J.H., et Drabkin, D.L., J. Biol. Chem. 112 (1935) 67.
4. Barron, E.S.G., J. Biol. Chem. 121 (1937) 285.
5. Barron, E.S.G., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 7 (1939) 154.
6. Benhamou, N., J. Chim. Phys. 53 (1956) 44.
7. Chalopin, H., et Colson-Guastalla, H., Bull. Soc. Chim. Biol. 31 (1949) 669.
8. Clark, W.M., Taylor, J.F., Davies, T.H., et Lewis, R., Compt.rend. Trav. Lab. Carlsberg, ser. chim. 22 (1938) 129.
9. Conant, J.B., J. Biol. Chem., 57 (1923) 401.
10. Conant, J.B., et Fieser, L.F., J. Biol. Chem. 62 (1924-25) 595.
11. Conant, J.B., et Scott, N.D., J. Biol. Chem. 76 (1928) 207.
12. Conant, J.B., et Pappenheimer, A.M. Jr., J. Biol. Chem., 98 (1932) 57.
13. Coryell, C.D., J. Phys. Chem. 43 (1939) 841.
14. Coryell, C.D., Stitt, F., et Pauling, L., J. Am. Chem. Soc. 59 (1937) 633.
15. Coryell, C.D., et Pauling, L., J. Biol. Chem. 132 (1940) 769.
16. Cubin, H.K., Biochem. J. 23 (1929) 25.

17. Dognon, A., Bull. Soc. Chim. Biol. 23 (1941) 249.
18. Dognon, A., et Gougerot, L., Bull. Soc. Chim. Biol. 29 (1947) 702.
19. Drabkin, D.L., et Austin, J.H., J. Biol. Chem. 112 (1935) 51.
20. Drabkin, D.L., et Austin, J.H., J. Biol. Chem. 112 (1935) 89.
21. George, P., et Hanania, C., Biochem. J. 55 (1953) 236.
22. Gougerot, L., Thèse, Paris (1947).
23. Greenstein, J.B., J. Biol. Chem., 125 (1938) 501.
24. Haurowitz, F., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 138 (1924) 68.
25. Haurowitz, F., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 169 (1927) 235.
26. Kauzmann, W., Denaturation of Proteins and Enzymes, in Mechanism of Enzyme Action, McElroy et Bentley-Glass, Baltimore 1954.
27. Keilin, D., Proc. Roy. Soc. (B), London, 100 (1926) 129.
28. La Mer, V.K., Science 86 (1937) 614.
29. Levy, M., et Banaglia, A.E., J. Biol. Chem. 186 (1950) 829.
30. Lewis, P.S., Biochem. J. 20 (1926) 965.
31. Neurath, H., Greenstein, J.P., Putnam, F.W., et Erickson, J.D., Chem. Rev. 34-35 (1944) 157.
32. Pauling, L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 21 (1935) 186.
33. Perutz, M.F., Haemoglobin. A Symposium in Memory of Sir Joseph Barcroft, Butterworths, London 1949.
34. Riggs, A.F., J. Gen. Physiol. 36 (1952) 1.
35. Roberts, R.M., J. Am. Chem. Soc. 64 (1942) 1472.
36. Sörensen, S.P.L., et Linderstöm-Lang, K., Compt. rend. Trav. Lab. Carlsberg 15 (1924) 40.
37. Steinhardt, J., J. Biol. Chem. 123 (1938) 543.

38. Steinhardt, J., et Zaiser, E.M., J. Biol. Chem. 190 (1951) 197.
 39. Steinhardt, J., et Zaiser, E.M., J. Am. Chem. Soc. 75 (1953) 1599.
 40. Taylor, J.F., J. Biol. Chem. 144 (1942) 7.
 41. Taylor, J.F., et Hastings, A.B., J. Biol. Chem. 131 (1939) 649.
 42. Taylor, J.F., et Hastings, A.B., J. Biol. Chem. 144 (1942) 1.
 43. Taylor, J.F., et Morgan, V.E., J. Biol. Chem. 144 (1942) 15.
 44. Vacher, M., Lortie, Y., et Colson, H., Bull. Soc. Chim. Biol. 26 (1944) 206.
 45. Wurmser, R., Filitti-Wurmser, S., et Briault, R., Rev. Canad. Biol. 1 (1942) 372.
 46. Wyman, J. Jr., J. Biol. Chem. 127 (1939) 1.
 47. Wyman, J. Jr., Adv. in Protein Chemistry, IV (1948) 407.
 48. Wyman, J. Jr., et Allen, D.W., J. Polymer Sci. 7 (1951) 499.
 49. Wyman, J. Jr., et Ingalls, E.N., J. Biol. Chem. 139 (1941) 877.
 50. Zaiser, E.M., et Steinhardt, J., J. Am. Chem. Soc. 73 (1951) 5568.
 51. Zaiser, E.M., et Steinhardt, J., J. Am. Chem. Soc. 76 (1954) 1788.
 52. Zaiser, E.M., et Steinhardt, J., J. Am. Chem. Soc. 76 (1954) 2866.
-

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Pile à plusieurs phases liquides (Pile de Beutner)

Vu et approuvé :

Paris, le 20 Mai 1956

Le Doyen de la Faculté des Sciences :

J. PERES

Vu et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris :

Jean SARRAILH

